

Université de Montréal

PHARMACOCINÉTIQUE DE POPULATION DE LA
MARBOFLOXACINE CHEZ LE CHEVAL

par

MATHIEU PEYROU

Département de biomédecine vétérinaire
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention
du grade Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences vétérinaires
option biomédecine

Décembre 2003

© Mathieu Peyrou, 2003



SF

607

U54

2004

V.022

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

PHARMACOCINÉTIQUE DE POPULATION DE LA
MARBOFLOXACINE CHEZ LE CHEVAL

présenté par

MATHIEU PEYROU

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean Sirois, président-rapporteur

Michèle Doucet, directeur de recherche

André Vrins, codirecteur de recherche

Serge Messier, membre du jury

RÉSUMÉ

La marbofloxacin est un antibiotique de la famille des fluoroquinolones, exclusivement destiné à la médecine vétérinaire. Son large spectre d'activité permet son utilisation dans de nombreuses pathologies équinés d'origine bactérienne. Le succès thérapeutique d'un traitement antibactérien étant fortement relié à la pharmacocinétique du médicament, il est important de bien connaître cette dernière pour ajuster la posologie.

La pharmacocinétique de population de la marbofloxacin a été étudiée chez 21 chevaux sains et 16 malades pour estimer la variabilité interindividuelle de l'exposition à cet antibiotique, en utilisant une analyse de modèles à effets mixtes. Aucune des covariables testées n'a été significativement corrélée aux volumes des compartiments ou à la clairance de distribution. Par contre, la clairance systémique a été corrélée ($p < 0.01$) au statut clinique (« malade » ou « sain ») du cheval lors de l'injection. La clairance avait une moyenne plus basse et une variance plus grande pour les chevaux malades par rapport aux sains, avec respectivement une moyenne de 0.209 et 0.284 L/h/kg et un coefficient de variation de 52% et 15%. Par conséquent la variabilité de l'exposition, mesurée par l'intermédiaire de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (ASC), était plus grande pour les malades. En considérant un ratio ASC/CMI inférieur à 60 comme prédictif d'une faible efficacité, une posologie de 2 mg/kg aurait été inadéquate pour 19% des chevaux avec une CMI de 0.1 µg/mL. Par contre, 93% des chevaux malades pouvaient atteindre un ratio supérieur à 125 pour la CMI_{90%} des *Enterobacteriaceae*.

MOTS-CLÉS : FLUOROQUINOLONE, MARBOFLOXACINE, CHEVAL, ÉQUIN, PHARMACOCINÉTIQUE DE POPULATION.

ABSTRACT

Marbofloxacin is a fluoroquinolone antimicrobial drug, developed for veterinary use. Its broad spectrum allows its use in many equine bacterial diseases. As the clinical outcome of an antibiotic therapy is related to the drug's pharmacokinetics, knowledge of the latter is useful to adjust drug regimens.

Population pharmacokinetics of marbofloxacin were investigated in 21 healthy and 16 diseased horses to assess interindividual variability of exposure, using mixed effects models analysis. None of the tested covariables were significant in regression models of compartmental volumes or distribution clearance, but the clinical status of the horse (healthy/diseased) was a significant covariable ($p < 0.01$) for systemic clearance. Clearance had a lower mean and a higher variance for diseased horses than healthy horses, with a mean of 0.209 and 0.284 L/h/kg and a coefficient of variation of 52% and 15% respectively. Consequently, variability of AUC was higher in diseased horses. Considering an AUC/MIC ratio below 60 as predictive of poor efficacy, a dosage regimen of 2 mg/kg intravenous was deemed to be inadequate for 19% of diseased horses if the MIC of the bacteria involved was 0.1 $\mu\text{g/mL}$. However 93% of diseased horses can achieve a ratio above 125, predicting a very good efficacy, for the MIC_{90%} of *Enterobacteriaceae* (0.027 $\mu\text{g/mL}$).

KEY-WORDS: FLUOROQUINOLONE, MARBOFLOXACIN, HORSES, EQUINE, POPULATION PHARMACOKINETIC.

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	IX
INTRODUCTION	1
RECENSION DE LA LITTÉRATURE	2
1. La marbofloxacin e et sa famille d'antibiotiques: les fluoroquinolones.....	3
1.1 Les fluoroquinolones en médecine humaine et vétérinaire	3
1.1.1 Historique – découverte	3
1.1.2 Propriétés physico-chimiques	4
1.1.3 Mécanismes d'action	5
1.1.4 Spectre d'activité	6
1.1.5 Résistance	6
1.1.6 Propriétés pharmacocinétiques	8
1.1.7 Propriétés pharmacodynamiques	10
1.1.8 Interactions médicamenteuses, tolérance et toxicité	13
1.1.9 Utilisation des fluoroquinolones	15
1.1.10 Utilisation vétérinaire et implication en santé publique.....	16
1.2 La marbofloxacin e.....	18
1.2.1 Propriétés générales	18
1.2.2 Pharmacologie chez les espèces animales autres que le cheval	19
1.2.3 Utilisation homologuée.....	22
1.2.4 Utilisation chez le cheval	23
1.2.5 Choix de la marbofloxacin e pour une étude de pharmacocinétique de population..	27
2. Pharmacocinétique de population	28
2.1 Définition et bases théoriques	28
2.1.1 Approche traditionnelle (« standard two stage », STS)	28
2.1.2 Approche populationnelle vraie	29
2.2 Applications	43
2.2.2 Ajustement des posologies.....	45
2.2.3 Calcul de temps d'attente.....	47

METHODOLOGIE	49
1. Animaux.....	49
2. Protocole d'administration et de récolte.....	50
3. Dosage de la marbofloxacin.....	50
4. Analyse pharmacostatistique	51
4.1 Modèle structurel.....	51
4.2 Modèle de régression.....	52
5. Exposition à la marbofloxacin et indices prédictifs de l'efficacité	54
ARTICLE	55
DISCUSSION.....	78
CONCLUSION.....	82
BIBLIOGRAPHIE	83

Liste des tableaux

<u>Tableau I</u>	<u>p.9</u>
<u>Tableau II</u>	<u>p.19</u>
<u>Tableau III</u>	<u>p.23</u>
<u>Tableau IV</u>	<u>p.24</u>
<u>Tableau V</u>	<u>p.24</u>
<u>Tableau VI</u>	<u>p.25</u>
<u>Tableau VII</u>	<u>p.34</u>
<u>Tableau VIII</u>	<u>p.35</u>
<u>Tableau IX</u>	<u>p.49</u>

Liste des figures

<u>Figure 1</u>	<u>p.4</u>
<u>Figure 2</u>	<u>p.5</u>
<u>Figure 3</u>	<u>p.11</u>
<u>Figure 4</u>	<u>p.13</u>
<u>Figure 5</u>	<u>p.21</u>
<u>Figure 6</u>	<u>p.21</u>
<u>Figure 7</u>	<u>p.32</u>
<u>Figure 8</u>	<u>p.33</u>
<u>Figure 9</u>	<u>p.35</u>
<u>Figure 10</u>	<u>p.36</u>
<u>Figure 11</u>	<u>p.38</u>
<u>Figure 12</u>	<u>p.42</u>
<u>Figure 13</u>	<u>p.46</u>
<u>Figure 14</u>	<u>p.48</u>

Liste des sigles et abréviations

ASC : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps

C_{max} : concentration maximale en antibiotique.

Cl : clairance systémique.

CMI : concentration minimale inhibitrice

PD : pharmacodynamie.

PK : pharmacocinétique.

PKpop: pharmacocinétique de population.

V_{ss} : volume de distribution à l'équilibre

A M.S.,

Pour cette merveilleuse année et celles qui viennent.

REMERCIEMENTS

Au Dr Michèle Doucet,

Pour avoir réconcilié un vétérinaire de campagne
avec la recherche et dirigé cette Maîtrise.

Au Dr Alain Bousquet-Mélou,

Pour son aide bienveillante et m'avoir fait découvrir la
pharmacologie.

Au Dr André Vrins,

Pour ses conseils et le débat d'idées lors des réunions.

A Didier Concordet,

Pour des Stats qui « volent »...

INTRODUCTION

La marbofloxacin est un antibiotique de la famille des fluoroquinolones, développé spécialement pour un usage vétérinaire [2]. Les fluoroquinolones sont des antibiotiques à large spectre qui peuvent être efficaces contre de nombreuses bactéries Gram négatives et certaines espèces bactériennes Gram-positif [3, 4]. Pour cette famille d'antibiotique, l'exposition du patient à la molécule, exprimée par la mesure de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (ASC), a été utilisée pour calculer des indices prédictifs d'efficacité [5]. Ainsi, une variation dans le degré d'exposition peut être associé à une variation dans la probabilité de chance de succès thérapeutique. La connaissance de ces variations associées aux processus physiopathologiques est un moyen d'ajuster la posologie d'un médicament. La pharmacocinétique de la marbofloxacin a été récemment décrite pour des chevaux sains [6, 7] mais aucune donnée n'a été publiée pour le cheval malade jusqu'à date.

Les objectifs de cette étude étaient (1) de déterminer la variabilité interindividuelle de l'exposition à la marbofloxacin, exprimée par l'ASC, chez les chevaux sains et malades dans un contexte clinique en utilisant des méthodes de pharmacocinétique de population, (2) d'étudier les corrélations des caractéristiques cliniques des chevaux avec l'exposition, et (3) d'examiner les conséquences cliniques de cette variabilité sur les probabilités de succès des traitements antibiotiques.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. La marbofloxacinine et sa famille d'antibiotiques: les fluoroquinolones

1.1 Les fluoroquinolones en médecine humaine et vétérinaire

1.1.1 Historique – découverte

L'utilisation des fluoroquinolones en médecine humaine débute dans les années 80 [8, 9] et représente une avancée considérable dans l'antibiothérapie. Ces molécules, entièrement synthétiques [10], sont alors des agents thérapeutiques novateurs par leur large spectre d'activité, leur faible toxicité et des propriétés pharmacocinétiques très favorables [11].

L'acide nalidixique, précurseur de la famille des fluoroquinolones, est découvert en 1962 et commercialisé trois ans plus tard [9, 12]. Il est caractérisé par un spectre d'activité antibactérien étroit (limité aux entérobactéries), un temps de demi-vie court et une très forte liaison aux protéines plasmatiques. En modifiant certains de ses constituants structurels [13, 14], la première véritable fluoroquinolone voit le jour en 1978 sous le nom de norfloxacinine [8, 15] et conjugue large spectre Gram négatif, temps de demi-vie prolongé et plus faible liaison aux protéines plasmatiques. Elle est rejointe dans le groupe des fluoroquinolones de première génération par la pefloxacinine [16], l'ofloxacinine [17] et la ciprofloxacinine [18]. Au cours des années 1980, les chercheurs s'emploient à développer une deuxième génération de molécules qui se caractérise par un spectre d'activité élargi vers certaines bactéries Gram positif : la sparfloxacinine [19], la grepafloxacinine [20] et la gatifloxacinine [21] sont ainsi synthétisées. A partir de la fin des années 1980, la recherche s'oriente vers la fabrication de molécules qui ont en plus une activité contre les bactéries anaérobies; on développe alors la clinafloxacinine [22], la trovafloxacinine [23], la moxifloxacinine [24] et la gemifloxacinine [25] qui rentrent dans le groupe des fluoroquinolones de troisième génération. De nombreuses autres molécules, encore

expérimentales, sont en cours de développement de nos jours. Actuellement, la recherche se poursuit vers une amélioration du spectre d'activité (anaérobies, streptocoques) et des propriétés pharmacocinétiques[11].

Parallèlement aux molécules développées pour la thérapeutique humaine, sept molécules, dont les structures sont reprises dans la figure 1, ont été développées pour un usage vétérinaire exclusif : l'enrofloxacin, la difloxacin, l'orbifloxacin, la danofloxacin, la sarafloxacin, la marbofloxacin et l'ibafloxacin.

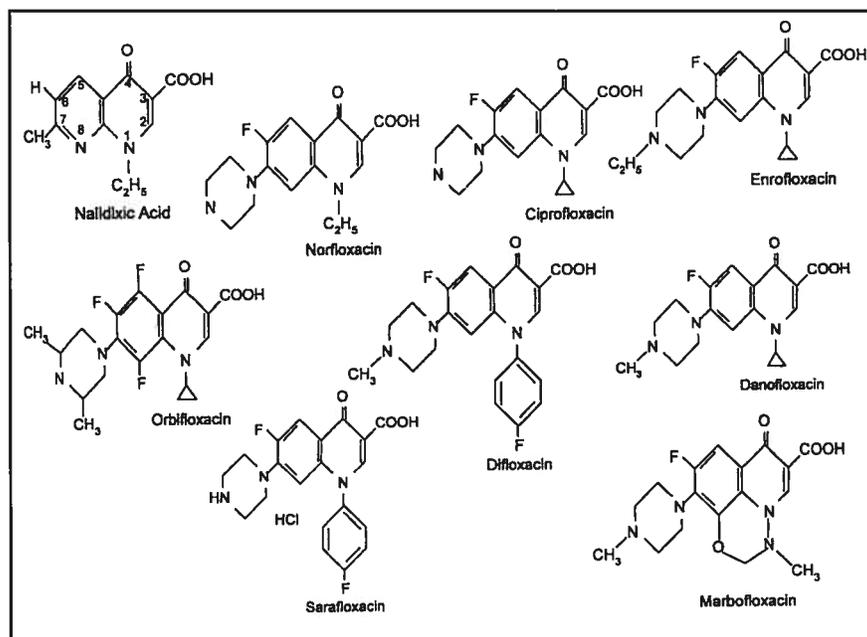


Figure 1 : Structures moléculaires des fluoroquinolones vétérinaires.
D'après [26].

1.1.2 Propriétés physico-chimiques

Les ancêtres des molécules récentes de la famille des fluoroquinolones sont des 4-quinolones tels que l'acide nalidixique et l'acide oxolinique. Ces molécules sont actives seulement contre certaines bactéries Gram- et les effets secondaires sont importants. Plusieurs milliers de nouvelles molécules ont été dérivées de cette première molécule en vue d'améliorer ses propriétés[14]. Les principaux sites actifs sont décrits dans la figure 2.

Parmi les principales modifications, on peut citer :

- l'ajout d'un atome de fluor en position 6 du noyau 4-quinolone. Il en résulte une augmentation de l'activité vis-à-vis des bactéries Gram négatives et Gram positives.
- la variation de résidus en position N-1 et C-7. Il en résulte des variations dans le spectre d'activité (par exemple, action sur les *Pseudomonas* spp.), l'absorption et la toxicité propre à chaque molécule.

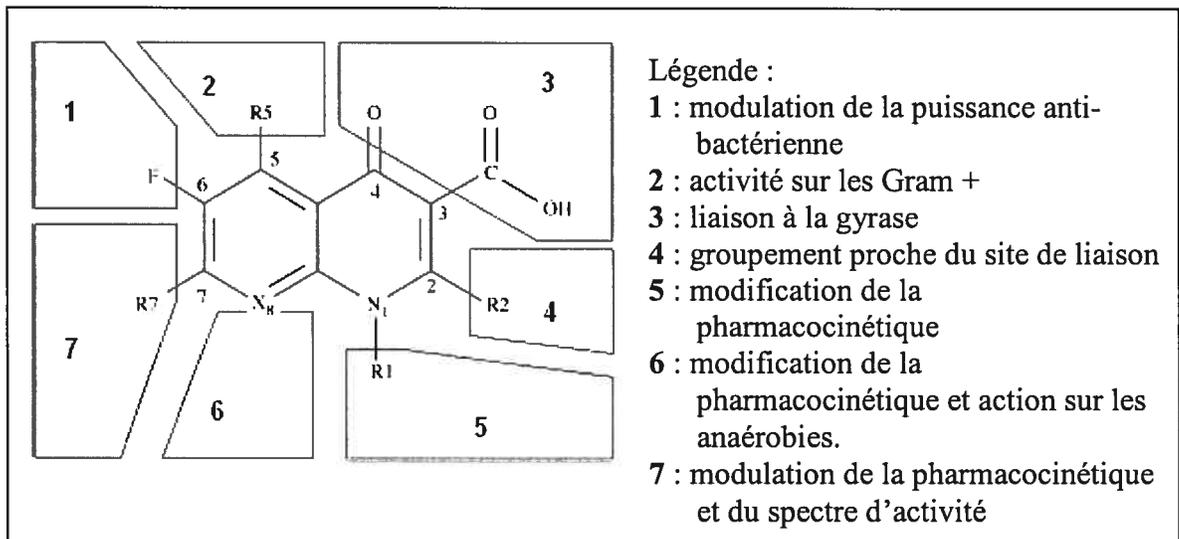


Figure 2 : Relation structure-activité des fluoroquinolones, d'après[27].

1.1.3 Mécanismes d'action

L'action des fluoroquinolones s'effectue au niveau de l'ADN bicaténaire des organismes procaryotes, et plus précisément sur des enzymes appelées topoisomérases : l'ADN-gyrase et la topoisomérase IV. L'ADN-gyrase est une enzyme de la famille des topoisomérases de type II [28, 29], qui permet des modifications dans la structure super-enroulée de l'ADN bactérien. L'ADN-gyrase est formée de 2 sous-unités A et B en paires, codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*, autour desquelles va s'enrouler le double brin d'ADN. La molécule de fluoroquinolone se lie au complexe ADN-gyrase/ADN et va ainsi entraîner des conséquences létales pour la bactérie. La topoisomérase IV [30] est une enzyme tétramérique C_2E_2 , encodée par les gènes *parC* et *parE*. Elle joue un rôle dans la

séparation des chromatides sœurs[31]. La formation d'un complexe fluoroquinolone/ADN-gyrase ou topoisomérase IV/ADN bloque la progression de l'anse de réplication et provoque une cassure du double brin d'ADN, ce qui entraîne la mort de la bactérie par un mécanisme encore mal compris [32]. Pour certaines bactéries, chaque fluoroquinolone semble avoir une cible bactérienne préférentielle (ADN-gyrase ou topoisomérase IV)[32, 33]. Par exemple, la sparfloxacine a une action préférentielle sur l'ADN-gyrase des bactéries Gram positif alors que la clinafloxacine ou la moxifloxacine ont une action similaire sur les deux types de topoisomérases[33].

1.1.4 Spectre d'activité

Le spectre d'activité antibactérienne des fluoroquinolones, d'abord limité aux bactéries Gram négatives, s'est progressivement étendu avec les progrès du génie pharmaceutique aux bactéries Gram positives [34], y compris *Staphylococcus aureus*, et aux bactéries anaérobies [35]. Le spectre d'action comprend également les *Mycoplasma* spp. et *Ureaplasma* spp., les *Chlamydia* spp., et les *Rickettsiae* spp. Les premières fluoroquinolones ont une activité faible à nulle sur les streptocoques, les entérocoques et les bactéries anaérobies. Les molécules développées plus récemment (sparfloxacine, clinafloxacine) ont une activité antibactérienne nettement supérieure [34], bien qu'un certain degré de résistance croisée avec les molécules plus anciennes puisse exister. Parmi les nouvelles fluoroquinolones, la clinafloxacine et la sitafloxacine ont parmi les meilleures activités *in vitro* sur les bactéries anaérobies[35].

1.1.5 Résistance

En thérapeutique humaine, les bactéries qui développent le plus fréquemment des résistances sont *Staphylococcus aureus*, en particuliers les souches résistantes à la méthicilline (SARM), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, et les entérocoques [36].

En médecine vétérinaire, l'exposition de bactéries d'origine canine provenant d'infections urinaires ou d'otites externes à l'enrofloxacin *in vitro* met en évidence un développement rapide de résistances chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus* spp [37]. Les bactéries *E.coli* et les staphylocoques n'ont pas développé de souches résistantes. Cependant, dans cette étude [37], de nombreux isolats ont évolué de la classe « sensible » à la classe sensibilité « intermédiaire ». Dans une autre étude [38], la proportion de bactéries résistantes à la ciprofloxacine ou à l'enrofloxacin provenant d'infections urinaires chez des chiens tend à augmenter entre 1992 et 2003.

Trois mécanismes peuvent entrer en jeu pour expliquer la résistance bactérienne aux fluoroquinolones [39]:

- **une diminution de la perméabilité de la membrane bactérienne par modifications des protéines de la membrane externe[40].**

Pour atteindre leurs cibles, les fluoroquinolones doivent traverser la membrane bactérienne. Ce phénomène est variable selon l'espèce bactérienne. La membrane externe de certaines bactéries Gram négatives, comme *Pseudomonas aeruginosa*, limite l'entrée des fluoroquinolones[41]. Si une modification de la structure de certaines protéines membranaires (porines) intervient, l'entrée des molécules d'antibiotiques sera encore plus faible.

- **une élimination active des fluoroquinolones par des pompes membranaires[42].**

L'expression de pompes membranaires va diminuer la concentration intrabactérienne en molécules de fluoroquinolones et ainsi permettre la survie de la bactérie dans un milieu qui possède une concentration théoriquement délétère pour cette dernière.

- **une modification des molécules cibles (ADN-gyrase, Topoisomérase IV).**

La présence d'une mutation sur les gènes codant pour une des sous-unités de l'ADN-gyrase ou de la topoisomérase IV peut entraîner une diminution de l'action des fluoroquinolones par diminution d'affinité entre les molécules et ainsi augmenter le niveau de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les mutations s'observent préférentiellement sur certaines séquences des gènes, dénommées QRDR (« Quinolone Resistance Determining Region »)[43]. La cause quasi-unique d'acquisition de résistance est l'apparition de mutations sur le chromosome bactérien. L'acquisition de résistance par

l'intermédiaire d'un plasmide a été décrite [44, 45] mais son importance reste mal élucidée et ses implications cliniques semblent faibles[46]. Une résistance de haut niveau est souvent la conséquence de plusieurs phénomènes consécutifs. Dans un premier temps, une mutation sur un gène codant pour une des topoisomérases apparaît et aboutit à une résistance de faible niveau. L'exposition à des concentrations modérées à faibles d'antibiotique va favoriser la croissance de cette souche et va ainsi permettre la sélection d'une souche possédant une deuxième mutation qui confèrera alors une résistance de haut niveau[47]. Des modifications membranaires peuvent compléter ce schéma de résistance. La présence de mécanismes de résistance bactérienne peut entraîner des échecs thérapeutiques. Il convient de limiter l'exposition des bactéries à des concentrations sub-inhibitrices. De plus, une concentration supérieure à 10 fois la CMI permet d'éviter tout phénomène de résistance en éliminant les souches possédant une mutation unique (résistance de bas niveau)[5, 48]. On observe généralement une résistance croisée entre les molécules de fluoroquinolone mais elle n'est pas systématique[39]. L'acquisition de modifications membranaires (porines modifiées, pompes actives) peut également entraîner une résistance croisée vis à vis d'agents antibactériens d'autres familles de molécules[39].

1.1.6 Propriétés pharmacocinétiques

Les propriétés pharmacocinétiques communes à la plupart des molécules utilisées en médecine humaine[49] et vétérinaire[26] sont rassemblées ci-après. Les propriétés de la marbofloxacin seront traitées dans un chapitre spécifique.

▪ Absorption

Les fluoroquinolones sont caractérisées par une très bonne absorption par voie orale chez l'homme et les espèces animales monogastriques [50, 51]. Associée à un long temps de demi-vie, leur excellente biodisponibilité a permis leur large diffusion et leur succès thérapeutique. Les molécules récentes utilisées en thérapeutique humaine ont une biodisponibilité variant de 90 à 99% [52, 53]. Chez le cheval, la biodisponibilité de l'enrofloxacin [51, 119] ou de la marbofloxacin [6] est comprise entre 60% et 80%. Pour toutes les espèces, l'absorption est rapide avec un temps pour atteindre la concentration maximale (T_{max}) généralement inférieur à trois heures (tableau I).

Tableau I : paramètres de la pharmacocinétique de différentes fluoroquinolones.

molécule	Dose - espèce	Tmax (h)	T1/2 (h)	F(%)
Marbofloxacin [54]	1.25 mg/lb PO- chien	1.5	10.7	ND
Difloxacin [55]	5 mg/kg PO- chien	2.8	9.3	ND
Enrofloxacin[51]	7.5 mg/kg PO - cheval	ND	10.62	78.29
Levofloxacin [52]	500mg PO - homme	1.3	7.4	ND

ND : non disponible.

▪ **Distribution**

Dans toutes les espèces, les fluoroquinolones se distribuent largement dans les tissus corporels avec un volume de distribution supérieur à 1.5L/kg. Elles pénètrent facilement de nombreux tissus avec des concentrations qui dépassent souvent celles du plasma (tissu pulmonaire, mucus bronchique et macrophages alvéolaires, tissus mous y compris prostate)[56]. Les fluoroquinolones se concentrent également dans les neutrophiles et les macrophages. Par contre, la concentration dans le liquide cébrospinal est plus faible (environ 20% des concentrations plasmatiques)[49]. Chez les chevaux, le volume de distribution à l'équilibre varie entre 2-2.5 L/kg pour l'enrofloxacin [51, 119] et 1.2-1.5 L/kg pour la marbofloxacin [6, 7]. La fixation aux protéines plasmatiques est variable pour les molécules utilisées en thérapeutique humaine. La norfloxacin et la gatifloxacin[57] ont les fixations les plus faibles (10-20%) tandis que la clinafloxacin et la trovafloxacin les plus fortes (60-70%). Pour les molécules utilisées en médecine vétérinaire, la fixation aux protéines plasmatiques est généralement faible, de l'ordre de 10 à 40%[4].

▪ **Métabolisme et excrétion**

La plupart des molécules ont une clairance faible à modérée et un temps de demi-vie de 4 à 10 heures (tableau I). Dans une optique de simplification, on peut classer les molécules en trois groupes selon leur mode d'élimination principale[49] :

- Clairance essentiellement rénale : Ofloxacin, temafloxacin, lomefloxacin, levofloxacin, gatifloxacin.

- Clairance essentiellement hépatique: Pefloxacin, moxifloxacin.
- Clairance rénale et hépatique: Norfloxacin, ciprofloxacin, enofloxacin.

Les paramètres du métabolisme et de l'excrétion des fluoroquinolones vont varier avec différentes covariables. On observe physiologiquement des différences dans la pharmacocinétique des personnes âgées : augmentation de la concentration plasmatique maximale, augmentation de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (ASC), diminution de la clairance. Cependant, aucune des ces altérations n'est significativement assez importante pour justifier un ajustement systématique de la posologie. Par contre des modifications plus graves, dues à des états pathologiques (insuffisance rénale ou hépatique), peuvent justifier pleinement des changements dans la posologie. Les molécules récentes (levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin) bénéficient d'études pharmacocinétiques plus complètes qui mettent en évidence des variables démographiques et/ou cliniques à prendre en considération pour établir la posologie. Par exemple, la lévofloxacin démontre un volume de distribution qui sera mieux estimé en prenant comme covariables le genre, la race et l'âge chez les patients gravement malades [1].

L'enrofloxacin administrée chez les chevaux démontre parfois une pharmacocinétique très hétérogène puisque le coefficient de variation de l'ASC associé à une administration par voie orale peut atteindre des valeurs élevées. Langston, en 1996, rapporte un coefficient de variation de 76%. Cette forte variabilité de l'ASC n'a pas été rapportée pour la marbofloxacin avec un coefficient de variation d'environ 20% pour la voie orale chez le cheval [6], mais les études sont moins nombreuses.

1.1.7 Propriétés pharmacodynamiques

1.1.7.1 Données in vitro

Les fluoroquinolones sont des agents antibactériens de type concentration-dépendant ayant un effet post-antibiotique modéré à marqué selon les molécules[58]. Plus la concentration est élevée, plus la vitesse et la capacité bactéricide est importante (figure 3). De plus, la propension des fluoroquinolones à sélectionner une souche résistante peut être

caractérisée par des modèles de pharmacodynamie *in vitro* qui miment le profil des concentrations obtenues *in vivo*. La concentration nécessaire pour obtenir une réduction du nombre de bactéries est beaucoup plus importante à 4 heures qu'après 24 heures le début de l'incubation (figure 3). Un rapport C_{max}/CMI supérieur à 10 est souhaitable pour limiter la sélection de résistance[48].

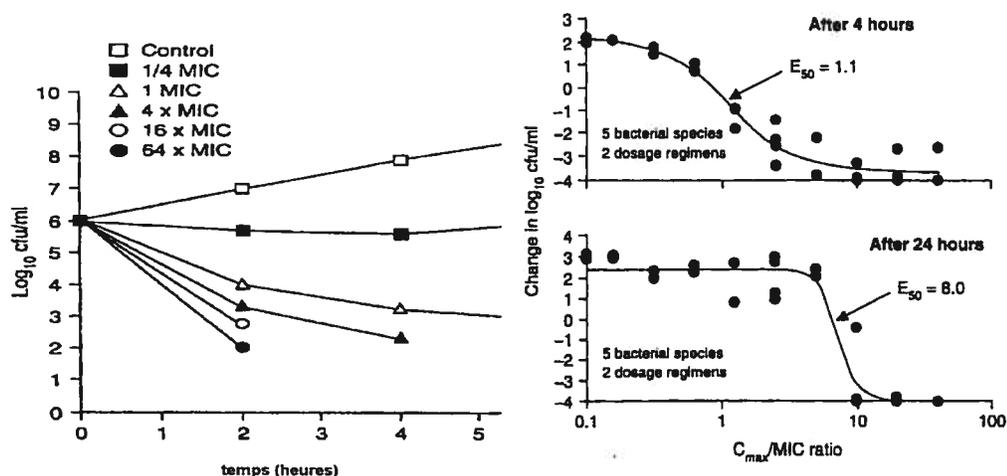


Figure 3 : A gauche : courbe de bactéricidie de *Pseudomonas aeruginosa* selon des concentrations croissantes de ciprofloxacine[58]. La vitesse de bactéricidie croît avec l'augmentation des concentrations. A droite : courbe de bactéricidie après quatre heures ou après 24 heures dans un modèle de pharmacodynamie *in vitro* [48]. Il faut un rapport C_{max}/CMI supérieur à 1.1 pour obtenir une réduction du nombre de bactérie 4 heures après incubation tandis que ce rapport doit être supérieur à 8 après 24 heures d'incubation.

1.1.7.2 Les indices prédictifs PK/PD

Les indices prédictifs PK/PD sont des indices calculés qui associent données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques pour essayer de prédire les probabilités de succès d'un traitement et les risques de sélection d'une souche résistante[59, 60]. Trois indices sont actuellement utilisés pour les antibiotiques[5, 61, 62] :

- **ASC/CMI** : rapport entre l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps et la concentration minimale inhibitrice de la souche bactérienne (CMI).
- **C_{max}/CMI** : concentration plasmatique maximale divisée par la CMI.
- **T_{Cp>CMI}** : temps pendant lequel les concentrations plasmatiques restent au dessus de la CMI (exprimé en pourcentage).

Les deux premiers indices sont utilisés essentiellement pour les antibiotiques de type concentration-dépendant (fluoroquinolones, aminoglycosides ...) tandis que le troisième s'utilise plutôt pour des antibiotiques de type temps-dépendant (pénicillines, céphalosporines, macrolides...). Leur utilisation repose sur la détermination de valeurs critiques. Ces valeurs critiques déterminent la limite pour une bonne efficacité thérapeutique ou un risque minimal de sélectionner une souche résistante. Elles ont été actuellement déterminées le plus souvent pour des thérapies humaines ou pour des modèles utilisant des animaux de laboratoire[63]. Les corrélations obtenues n'ont pas été vérifiées pour la plupart des espèces animales et en particuliers pour le cheval[61, 63].

En médecine humaine, un consensus se dégage pour dire que l'on doit rechercher des valeurs ASC/CMI qui soient supérieures à 125[64-66] lors de l'utilisation des fluoroquinolones (figure 4) mais des valeurs d'environ 60-80 sont susceptibles d'être efficaces, spécialement chez les patients immunocompétents [61]. Sur des souris neutropéniques dans un modèle d'infection respiratoire[67], une valeur de 100-125 doit être atteinte pour obtenir une protection efficace. Pour ce qui est du rapport C_{max}/CMI, les modèles animaux expérimentaux comme les essais en médecine humaine s'accordent pour dire qu'il doit être supérieur à 8-10 pour les fluoroquinolones afin d'avoir une excellente efficacité et des risques minima de sélectionner une souche bactérienne résistante[61] (figure 4). L'indice T_{C_{plasma}>CMI} est mal corrélé avec la réponse clinique ou la sélection de souches bactériennes résistantes pour les fluoroquinolones bien que certains auteurs considèrent que ceux-ci pourrait avoir une action temps-dépendante sur certaines bactéries Gram-positif [5, 61]. D'autres auteurs sont plus en faveur d'une action concentration-dépendante même sur les bactéries Gram-positif (Neinen, 95).

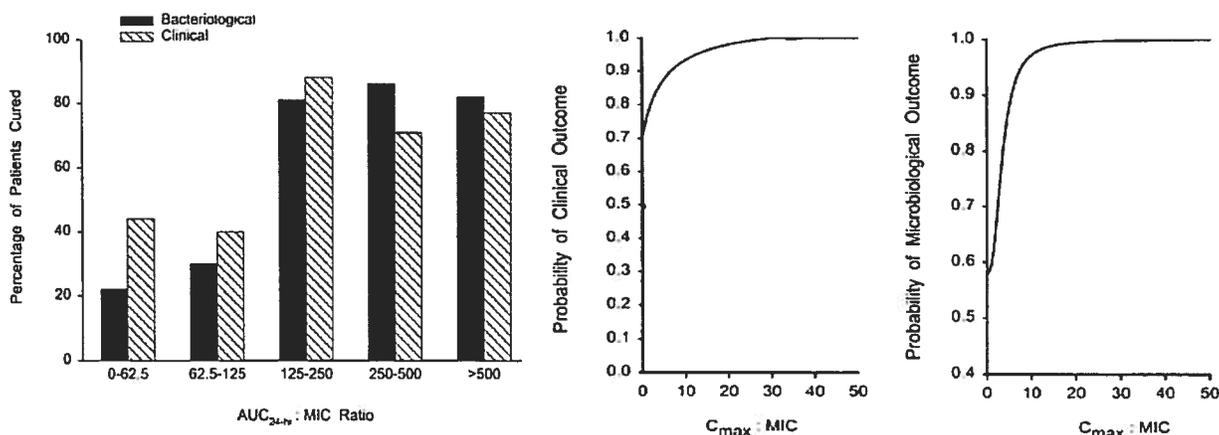


Figure 4 : A gauche : relation entre le rapport ASC/CMI pour la ciprofloxacine et le pourcentage de guérison bactériologique et clinique chez des patients humains[66]. Au dessus de 125, le pourcentage de guérison est nettement meilleur. A droite : relation entre le rapport C_{max}/CMI de la levofloxacine et le pourcentage de guérison clinique et microbiologique chez des patients humains. Dans les deux cas, un rapport supérieur à 10 donne les meilleurs résultats [68].

1.1.8 Interactions médicamenteuses, tolérance et toxicité

L'étude des interactions médicamenteuses est un aspect important du dossier d'homologation des médicaments mais les études publiées chez l'animal sont assez rares. Les principales interactions médicamenteuses décrites en médecine humaine sont :

- Anti-acides, suppléments minéraux et sulcrafate [69-71].

Les fluoroquinolones réagissent avec les produits contenant des cations bivalents (magnésium, aluminium, calcium, zinc...). Il se forme des complexes insolubles qui limitent considérablement l'absorption et peuvent expliquer des échecs thérapeutiques.

- Probenecid et antagonistes H₂[72, 73].

Le probenecid et la cimétidine sont capables de réduire la sécrétion tubulaire des fluoroquinolones. Cependant la diminution de la clairance corporelle n'est pas cliniquement ou statistiquement significative.

- Théophylline et dérivés xanthiques[74, 75]

Les fluoroquinolones peuvent inhiber la clairance hépatique des bases xanthiques par inhibition des cytochromes P450 (isoenzyme 1A2). La capacité d'inhibition du métabolisme est fonction de la molécule : l'énoxacine semble avoir l'action inhibitrice la plus significative. A 5 mg/kg chez le chien, la marbofloxacin diminue de 26 % la clairance de la théophylline et augmente l'ASC de manière statistiquement significative[76].

- AINS[77, 78]

L'apparition de convulsions a été notée lors de l'utilisation concomitante d'énoxacine et de fenbufen chez l'Homme et le rat. Cependant aucune interaction de ce type n'a été démontrée avec les fluoroquinolones plus récentes.

En thérapeutique humaine, les fluoroquinolones sont des molécules considérées comme sécuritaires et bien tolérées[79, 80]. Le pourcentage d'effets indésirables varie d'une molécule à l'autre mais oscille entre 3 et 40%. La fréquence des effets indésirables est comparable à celle des autres classes d'agents antibactériens : 2-49% pour le triméthoprime-sulfaméthoxazole, 6-35% pour les pénicillines, 12-39% pour les céphalosporines, 19-23% pour la doxycycline et 39% pour l'érythromycine chez l'homme[80, 81]. Les effets sur le tractus digestif (anorexie, nausées, vomissements, diarrhée) et le système nerveux (maux de tête, étourdissements, somnolence, et plus rarement convulsions) sont les effets indésirables les plus fréquents [79, 82]. Les symptômes myoarthrosquelettiques semblent plus fréquents chez les animaux que chez l'Homme. Cependant, de la douleur articulaire, de la raideur ou encore de la distension articulaire ont pu être observées chez l'Homme[83]. La prise de fluoroquinolones a été associée à un risque de rupture tendineuse ou de tendinite[84, 85]. Chez l'animal, l'administration de fluoroquinolones à cinq fois la dose normale provoque des lésions cartilagineuses chez les jeunes rats[86], les chiots[87], les cochons d'Inde, les lapereaux,

et les primates [88]. Des doses élevées ont également été incriminées dans des arthropathies chez les poulains [96]. Des anomalies hématologiques[82] ont également été recensées tels que de l'anémie, de la méthémoglobinémie, de la leucopénie et une modification du nombre de plaquettes. Chez le chat, il a été observé de la dégénérescence rétinienne avec des doses élevés d'enrofloxacin[89].

1.1.9 Utilisation des fluoroquinolones

Le large spectre des fluoroquinolones à usage vétérinaire[90-92] et la possibilité de les administrer par voie orale à raison d'une fois par jour ont abouti au grand succès de ces molécules en médecine des animaux de compagnie. Les indications sont très nombreuses, telles que les infections du tractus urinaire, les infections respiratoires, les pyodermites, les péritonites, les otites, les infections de plaies ou encore les ostéomyélites. Peu d'effets indésirables ont été rapportés et avec une fréquence moindre qu'en médecine humaine. Chez le chien[93], on a observé des vomissements et de l'anorexie, plus rarement des symptômes nerveux peuvent survenir (ataxie, léthargie, convulsions, nervosité). Chez le chat traité avec de l'enrofloxacin[89, 94], de rares cas de signes oculaires ont été signalés avec mydriase, dégénérescence rétinienne et perte de la vision. Les jeunes animaux ne doivent pas être traités avec ces molécules, à cause de la toxicité sur les cartilages en croissance[87]. On conseille d'attendre 8 mois pour les races de chiens de petites tailles et jusqu'à 18 mois pour des races plus lourdes.

Pour les animaux de consommation, les tests de sensibilité bactérienne aux antibiotiques démontrent le fort potentiel des fluoroquinolones sur les pathogènes des atteintes respiratoires aiguës des bovins, ovins ou caprins (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* et *Haemophilus somnus*) et sur les bactéries Gram négatif pathogènes majeures du bétail (*E.coli*, *Salmonella*). Aux États-Unis, les fluoroquinolones sont approuvées seulement pour les pneumonies aiguës pour les bovins de boucherie et l'usage en dérogation de directives de l'étiquette est strictement interdit. L'enrofloxacin et la sarafloxacin sont disponibles en formulations spécifiques pour les volailles qui permettent leur administration dans l'eau de boisson. Les deux molécules sont homologuées pour le traitement des infections à *E.coli* chez les poulets et les dindes. Les

fluoroquinolones sont une famille d'antibiotique efficace dans le traitement et la prévention de pathogènes majeurs des porcins : *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *E.coli* et *Pasteurella multocida*. Cependant, à cause de la possible augmentation de résistance bactérienne associée à leur emploi pour cette espèce, les fluoroquinolones sont interdites chez le porc dans certains pays (États-Unis).

Les fluoroquinolones sont utilisées en médecine équine lorsqu'une résistance bactérienne est observée avec l'antibiotique utilisé en première ligne, bien qu'aucune molécule ne soit homologuée dans cette espèce. La résistance aux fluoroquinolones est peu fréquente, en particulier pour les *E.coli*, les *Enterobacter* spp. et les *Pseudomonas* spp [95]. La principale crainte reliée à l'utilisation des fluoroquinolones chez le cheval porte sur une éventuelle toxicité cartilagineuse, en particulier chez le poulain. L'administration d'enrofloxacin à la dose de 10 mg/kg chez le poulain induit des signes de lésions articulaires dès la première semaine de traitement[96]. Chez le cheval adulte, quelques cas rapportés[97, 98] de signes cliniques de lésions articulaires à la suite d'un traitement par l'enrofloxacin existent. Cependant, dans une autre étude, une dose de 5 mg/kg IV une fois par jour pendant 3 semaines n'a pas réussi à induire de signes cliniques[99]. Les études *in vitro* démontrent la toxicité de l'enrofloxacin sur les chondrocytes, mais à des doses élevées (non thérapeutiques) [100, 101]. Cependant, une modification morphologique du cytosquelette a été démontrée à des concentrations observables avec des doses thérapeutiques[102]. Une toxicité pour le système nerveux central a été décrite pour des doses supérieures aux doses homologuées (15 et 25 mg/kg) et par voie intraveineuse rapide. Les signes neurologiques d'ataxie se résolvent en moins de 10 minutes et sont réduits avec une injection lente ou une perfusion.

1.1.10 Utilisation vétérinaire et implication en santé publique

L'utilisation des fluoroquinolones en médecine vétérinaire fait l'objet de nombreux débats relatifs aux dangers potentiels qu'elle pourrait représenter pour la santé publique[103-106]. Une préoccupation majeure est de savoir si leur utilisation « vétérinaire » peut augmenter la résistance bactérienne aux antibiotiques chez l'Homme[60]. Deux types de transmission sont évoqués : soit la transmission d'une bactérie résistante de l'animal à

l'Homme et causant une maladie humaine (zoonose)[104], soit la transmission de gènes de résistance par une bactérie d'origine animale à une bactérie pathogène pour l'Homme[104, 105]. S'il est généralement admis que des bactéries « animales » et « humaines » peuvent s'échanger de l'information génétique, l'importance de ces échanges et les conséquences sur la résistance des bactéries pathogènes pour l'Homme ne sont pas bien comprises, certains auteurs la jugeant négligeable par rapport à la résistance provoquée par l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine, d'autres y voyant un réel danger qu'il convient de contrôler au plus vite.

Ce conflit d'opinion s'est cristallisé autour de la question de l'utilisation des promoteurs de croissance (aliments supplémentés en antibiotiques) en élevage industriel[103, 106]. Ces antibiotiques, employés pour favoriser la croissance, pourraient être à l'origine de l'augmentation de résistance observée chez certaines bactéries de l'Homme (*Campylobacter jejuni* résistant aux fluoroquinolones, enterococci résistant à la vancomycine...)[104, 105]. Ce danger potentiel a conduit les autorités réglementaires européennes à bannir l'utilisation de certains promoteurs de croissance (avoparcine, virginiamycine, tylosine...). Les opposants à cette mesure mettent en avant l'augmentation de la quantité d'antibiotiques utilisée en thérapeutique pour contrebalancer la perte des antibiotiques employés de manière prophylactique. La diminution de la qualité sanitaire des carcasses pourrait également être à l'origine d'une augmentation des cas d'infections alimentaires.

Les preuves scientifiques étayant chaque théorie étant peu nombreuses et souvent contradictoires, l'utilisation ou le bannissement de certains antibiotiques de l'arsenal vétérinaire est actuellement plus un choix politique dans la gestion des risques qu'une attitude véritablement rigoureuse. L'opinion publique joue alors un rôle important dans les prises de décisions. La recherche doit se poursuivre pour évaluer plus exactement l'implication des antibiotiques vétérinaires dans la résistance des bactéries pathogènes pour l'Homme.

1.2 La marbofloxacin

1.2.1 Propriétés générales

1.2.1.1 Propriétés physico-chimiques – formule

La marbofloxacin est l'acide 9-fluoro- 2,3-dihydro- 3 méthyl- 10(4-méthyl-1-piperaziny)- 7-oxo- 7H- pyrido(3,2,1-ij) (4,1,2) benzoxadiazine-6 carboxylique, qui possède la structure classique des fluoroquinolones (figure 1)[2]. Elle se présente sous la forme d'une poudre jaune pâle peu soluble dans l'eau et légèrement instable à la lumière. Le poids moléculaire est de 362,36 g.mol⁻¹[107].

1.2.1.2 Mécanismes d'action, spectre d'activité et résistance

Comme les autres fluoroquinolones, la marbofloxacin est un agent antibactérien bactéricide, de type concentration dépendant, avec un effet post-antibiotique marqué pour les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, et elle agit sur l'ADN bactérien. Le spectre d'activité est semblable aux autres fluoroquinolones commercialisées en médecine vétérinaire[90], c'est à dire une très bonne sensibilité de la plupart des bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *E.coli*, *Enterobacter* spp., *Campylobacter* spp, *Shigella* spp., *Salmonella*, *Aeromonas*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Yersinia*, *Serratia* spp.) Les *Brucella* spp., *Chlamydia trachomatis*, staphylocoques (y compris ceux produisant des pénicillinases ou les souches résistantes à la methicilline), et les mycoplasmes sont généralement sensibles[3, 4]. L'action sur les streptocoques est plus variable tandis que les anaérobies sont majoritairement résistants[108].

Les résistances sont plus particulièrement observées pour les bactéries suivantes : les streptocoques, les enterococci, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter* spp. Lors de pyodermites canines[93], les bactéries associées à un échec thérapeutique sont les entérocoques et *Streptococcus agalactiae*. Pour les *Pseudomonas* spp.[109] et les staphylocoques coagulase positif, le pourcentage de souches résistantes est généralement inférieur à 5%.

1.2.2 Pharmacologie chez les espèces animales autres que le cheval

1.2.2.1 Propriétés pharmacocinétiques

Les principaux paramètres de la pharmacocinétique de la marbofloxacin sont rassemblés dans le tableau II. On note un pic des concentrations plasmatiques rapide (inférieure à 2 heures), un volume de distribution large (supérieur à 1 L/kg), un temps de demie-vie long et une très bonne biodisponibilité. Chez le chien, la présence d'une insuffisance rénale modérée ne nécessite pas d'ajustement de posologie[110].

Tableau II : principaux paramètres de la pharmacocinétique de la marbofloxacin administrée à la dose de 2 mg/kg chez différentes espèces et par différentes voies d'administration.

Espèces	Voies d'administration	Tmax (h)	Cmax (µg/mL)	T1/2 (h)	Vss (L/kg)	F (%)
Chien [2, 111]	IV			12.4	1.36	
	SC	0.92	1.52	13.0		98.7
	PO	1.76	1.35	9.77		99.77
Veau [112]	IV			4.23	1.09	
	IM	0.51	1.50	4.33		104.17
Bovin ruminant [113, 114]	IV			5.72	1.16	
	IM	0.79	1.47	7.73		112.85
	SC	0.73	1.15	5.49		110.94
Porcin [113]	IV			8.22	1.30	
	PO					Env 80%

1.2.2.2 *Activité antibactérienne*

L'efficacité et la sensibilité bactérienne à la marbofloxacin ont été essentiellement étudiées chez le chien. Des études réalisées en Europe[115] et en Amérique de Nord[93] démontrent son efficacité pour les pyodermites canines. Son spectre d'action inclut les principaux pathogènes de la peau du chien, comme *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. et *E.coli*[93]. Le succès thérapeutique de la marbofloxacin administrée par voie orale chez le chien dans des cas de pyodermites est de plus de 85% des cas[93, 115].

Dans une étude[109] portant sur 67 souches de staphylocoques « coagulase positif » provenant de chiens sains et atteints d'otite externe, la marbofloxacin démontre 94% de souches sensibles et 3% de souches résistantes, soit une proportion légèrement plus favorable que l'enrofloxacin qui n'a que 81% de souches sensibles. Cette tendance se retrouve sur d'autres espèces bactériennes puisque sur les souches de *Pseudomonas* spp. isolées de chiens avec otite chronique, le pourcentage de bactéries sensibles à la marbofloxacin est de 91% et de 52% pour l'enrofloxacin[116]. Enfin, dans une autre étude, sur 183 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de différentes localisations d'infections chez des chiens[109], 26% des souches étaient résistantes à l'enrofloxacin et 5% l'étaient pour la marbofloxacin. Les auteurs mettent en avant la non-utilisation, ou l'utilisation plus récente, de la marbofloxacin dans la zone de collecte des échantillons pour expliquer une partie du plus faible pourcentage de souches résistantes[109].

1.2.2.3 *Propriétés pharmacodynamiques*

La pharmacologie de la marbofloxacin a fait l'objet d'une étude chez le veau[112]. La marbofloxacin démontre une activité concentration dépendante vis-à-vis de *Mannheimia haemolytica* (figure 5) et les ratios ASC/CMI calculés pour obtenir une bactériostase, une activité bactéricide ou l'élimination complète de la bactérie sont respectivement de 37.1, 46.3 et 119.6 (figure 6). À la dose recommandée de 2 mg/kg, le rapport ASC/CMI est au dessus de 200 avec la posologie homologuée, permettant de prédire de grandes chances de

succès thérapeutique. Chez le chien, une dose de 2 mg/kg permet également d'obtenir des indices prédictifs favorables[117]. Le rapport C_{max}/CMI_{90} est proche de 12 pour des souches d'*E.coli* et de 6 vis à vis des souches de *Staphylococcus aureus*. L'indice ASC/CMI_{90} est de 105 et 52 pour les mêmes espèces bactériennes respectivement.

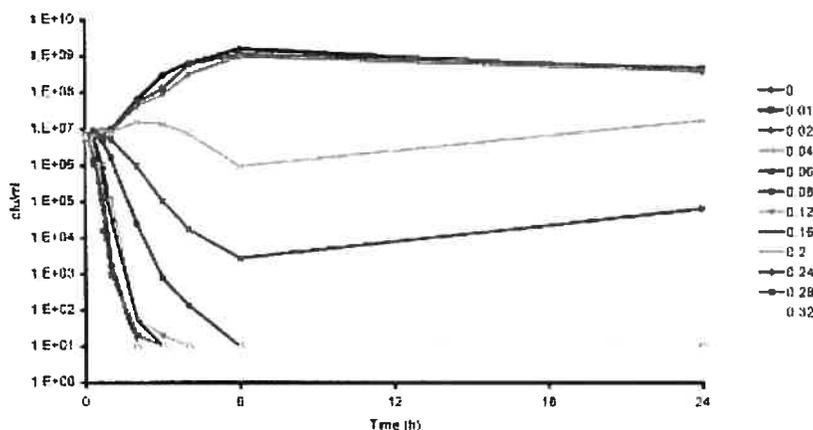


Figure 5 : courbe d'inhibition de croissance de *M.haemolytica* dans du sérum de veau [112] pour des concentrations croissantes de marbofloxacin *ex vivo*.

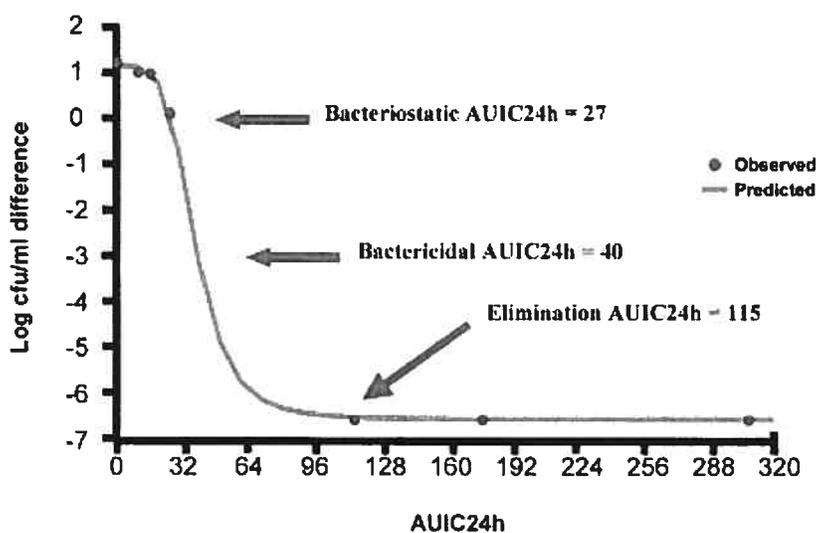


Figure 6 : relation de type E_{max} sigmoïde entre le comptage bactérien et l' $AUIC_{24h}$ *ex vivo* de marbofloxacin chez le veau [112].

1.2.2.4 Interactions médicamenteuses, tolérance et toxicité

La littérature ne traite pas, à ce jour, des interactions médicamenteuses de la marbofloxacin. Cependant, les interactions communes à la famille des fluoroquinolones (cf. 1.1.8) s'appliquent pour cette molécule particulière : interactions avec les substances contenant des cations (sulcralfate, anti-acides, suppléments minéraux) et les dérivés des bases xanthiques (théophylline).

Les effets indésirables sont généralement limités à des troubles digestifs : vomissements, anorexie, diarrhées. Dans un essai clinique[93] sur l'efficacité de la marbofloxacin dans le traitement des pyodermites portant sur 72 chiens, il a été observé de rares cas d'anorexie (2 cas), de la polydipsie (2 cas), apathie (2 cas), et un cas de vomissement, fèces molles et de flatulences. Le traitement a été interrompu pour un seul chien après 14 jours de traitement. Les effets secondaires ont cessé après interruption du traitement. Chez le chat, de la diarrhée et des vomissements sont également observés occasionnellement[118].

1.2.3 Utilisation homologuée

Aux États-Unis, la marbofloxacin est homologuée chez le chien et le chat pour des infections par des bactéries sensibles. La posologie est de 1.25 à 2.5 mg/lb *per os* une fois par jour. Au Canada, la marbofloxacin n'est homologuée que chez le chien. En Europe, la marbofloxacin est homologuée chez les bovins pour les infections respiratoires à *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* et *Mycoplasma bovis*, chez le porc pour le syndrome métrite-mammite-agalactie et chez le veau pour les gastro-entérites à *E.coli* K99+ sensible à la marbofloxacin (antibiogramme préalable). Pour les chiens, la marbofloxacin est approuvée pour les pyodermites superficielles et profondes, les infections du tractus urinaire associées ou non avec une prostatite ou épидидymite, et les infections du système respiratoire. Chez le chat, elle est homologuée pour les infections cutanées et sous-cutanées (abcès, phlegmon). De plus, par voie injectable, la marbofloxacin possède une indication pour la prévention des infections chirurgicales chez les animaux de compagnie.

1.2.4 Utilisation chez le cheval

1.2.4.1 Données pharmacocinétiques

Les données de la pharmacocinétique de la marbofloxacin chez le cheval ont fait l'objet de deux études récentes[6, 7], et sont rassemblées dans les tableaux III et IV. Par rapport aux autres espèces (tableau II), on note une biodisponibilité par voie orale inférieure à celle des carnivores, un temps de vie plus court que chez les carnivores domestiques mais semblable à celui des porcs et des veaux pré-ruminants. La marbofloxacin a une demi-vie semblable à celles des autres fluoroquinolones chez les équins : enrofloxacin (environ 5 h)[51, 119], orbifloxacin (9.06 h)[120] et fleroxacin (4.62 h)[121]. Les voies sous-cutanée et intramusculaires offrent une biodisponibilité élevée et un temps moyen d'absorption plus rapide que pour l'enrofloxacin par voie intramusculaire, moins d'une heure contre 8.2 h respectivement. Le volume de distribution est large, comparable à ceux déterminés pour d'autres espèces.

Tableau III : paramètres de la pharmacocinétique de la marbofloxacin chez le cheval avec une dose de 2 mg/kg. Les données sont inscrites sous la forme : moyenne (écart-type).

auteur	chevaux	voie	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	ASC (µg.h/mL)	V _{dss} (L/kg)	MRT (h)	MAT (h)
[6]	6	IV			8.26 (1.67)	1.48 (0.03)	5.96 (0.95)	
		SC	1.07 (0.3)	0.72 (0.31)	7.94 (1.025)		8.66 (1.41)	
		PO	0.89 (0.14)	0.58 (0.2)	5.11 (1)		8.97 (2.23)	
[7]	5	IV			11.27 (2.42)	1.17 (0.18)	6.35 (1.15)	
		IM	1.42 (0.33)	0.95 (0.37)	9.88 (2.41)		6.91 (0.95)	0.56 (0.24)

C_{max} : concentration plasmatique maximale. T_{max} : temps où la concentration plasmatique est maximale. ASC : aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps. V_{dss} : volume de distribution à l'équilibre. MRT : temps moyen de résidence. MAT : temps moyen d'absorption.

Tableau IV : paramètres de la pharmacocinétique de la marbofloxacin chez le cheval avec une dose de 2 mg/kg. Les données sont inscrites sous la forme : moyenne (écart-type).

auteur	voie	T1/2 (h)	Vd _{area} (l/kg)	Cl (l/kg*h)	F (%)	CV _F (%)
[6]	IV	7.56 (1.99)	2.83 (0.75)	0.249 (0.045)		
	SC	10.41 (4.27)			97.6 (11.3)	11.58
	PO	8.78 (2.7)			62.4 (8.12)	13.01
[7]	IV	4.74 (0.81)		0.19 (0.04)		
	IM	5.47 (1.33)			87.94 (6)	6.82

T1/2 : temps de demie-vie. Vd_{area} : volume de distribution de la phase terminale. Cl : clairance. F : biodisponibilité. CV_F : coefficient de variation de la biodisponibilité.

1.2.4.2 Activité antibactérienne

Le spectre d'activité de la marbofloxacin est semblable à celui des fluoroquinolones de deuxième génération utilisées en médecine humaine : très bonne efficacité sur les bactéries à Gram négatif, en particuliers *Enterobacteriaceae*, et spectre élargi aux bactéries à Gram positif. La réponse des *Pseudomonas aeruginosa* est difficile à prévoir à cause de CMI très variables. Les données de sensibilité sont peu nombreuses dans la littérature[6] (tableau V).

Tableau V : Concentration minimale inhibitrice de marbofloxacin pour des souches bactériennes d'origine équine obtenues en France et au Royaume-Uni[6].

Espèce bactérienne	Nombre de souches	Étendue de la CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>Enterobacteriaceae</i>	26	0.008-0.03	0.017	0.027
<i>S. aureus</i>	15	0.12-0.25	0.125	0.210
<i>Streptococcaceae</i>	21	0.5-2.0	0.854	1.667
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	0.12-2.0	NC	NC

Enterobacteriaceae = *Salmonella* spp. (11), *E.coli* (10), *Klebsiella pneumoniae* (5). *Streptococcaceae* = *Streptococcus zooepidemicus* (14), *Streptococcus equi* (7). Les valeurs de CMI sont données en µg/mL. NC = non calculé (nombre de souches testées trop faible).

1.2.4.3 Propriétés pharmacodynamiques

Les indices prédictifs de l'efficacité antibactérienne de la marbofloxacin sont ceux utilisés pour les fluoroquinolones en médecine humaine, ASC/CMI_{90} et C_{max}/CMI_{90} , bien qu'aucune étude de validation ne soit publiée à notre connaissance. Ces indices ont été calculés pour différentes voies d'administration[6] et sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI : valeurs calculées des indices prédictifs ASC/CMI_{90} et C_{max}/CMI_{90} à partir des paramètres pharmacocinétiques de la marbofloxacin administrée à 2 mg/kg chez le cheval. Données présentées sous la forme moyenne (écart-type).

	Voie d'administration		
	I.V.	S.C.	Per os
<i>MIC₉₀=0.027 µg/ml - Enterobacteriaceae</i>			
ASC_{24}/CMI_{90}	297 (90)	238 (30)	155 (21)
C_{max}/CMI_{90}	632 (450)	36 (7)	31 (4.5)
<i>MIC₉₀=0.21 µg/ml - Staphylococcus aureus</i>			
ASC_{24}/CMI_{90}	31 (11)	24 (4)	12 (2.4)
C_{max}/CMI_{90}	81 (69)	4.7 (0.89)	3.9 (0.58)

En extrapolant en médecine équine les valeurs critiques obtenues en médecine humaine ou chez les animaux de laboratoire pour les fluoroquinolones, on s'attend à une très bonne efficacité de la marbofloxacin vis à vis des *Enterobacteriaceae*, quelque soit la voie d'administration ($AUC/CMI_{90} \gg 125$ et $C_{max}/CMI_{90} \gg 10$)[6]. Pour les souches de *Staphylococcus aureus*, la situation est plus nuancée car les valeurs calculées sont plus proches ou inférieures aux valeurs critiques citées précédemment. Cependant, il faut prendre en compte que, premièrement, les valeurs critiques utilisées ont été estimées le plus souvent chez des patients humains gravement malades et/ou immuno-déficients alors que l'on va administrer la marbofloxacin chez des chevaux le plus souvent immunocompétents, et que, deuxièmement, l'utilisation de la CMI_{90} pour les calculs du tableau VI est une attitude très prudente. Certains auteurs utilisent préférentiellement la CMI_{50} qui permet d'obtenir des valeurs d'indices plus élevées. D'une manière rigoureuse,

c'est à dire en utilisant les valeurs d'indices citées plus hauts, une dose de 2 mg/kg doit permettre de traiter des infections avec des bactéries dont la CMI₉₀ est inférieure ou égale à 0.03 µg/ml. En adoptant une attitude plus tolérante, cette même dose devrait être possiblement efficace sur des bactéries dont la CMI₉₀ est proche de 0.2 µg/mL[6].

1.2.4.4 Tolérance et Toxicité

La marbofloxacin (Marbocyl®, laboratoire Vétoquinol) administrée par voie intramusculaire à la dose de 2 mg/kg induit une augmentation de l'activité plasmatique de la créatine-kinase[7]. L'activité enzymatique augmente d'environ huit fois la valeur pré-injection 12 heures après injection pour diminuer à trois fois la valeur de base après 24 heures[7]. Cependant aucune réaction indésirable n'a été observée cliniquement au point d'injection. Par comparaison, l'enrofloxacin (Baytril®, formulation commerciale) induit une inflammation plus importante par voie intramusculaire : on observe une enflure et de la sensation douloureuse dans la zone d'injection[119]. Les enzymes CK sont augmentées à plus de 10 fois leur valeur de base et restent élevées plus de 32 heures après injection. Cette inflammation importante et les lésions tissulaires induites pourraient expliquer le temps moyen de résidence et le temps moyen d'absorption beaucoup plus longs pour l'enrofloxacin (Baytril®) que pour la marbofloxacin (Marbocyl®). Par voie orale, aucun effet indésirable n'a été noté, comme pour l'enrofloxacin[6]. La toxicité de la marbofloxacin chez le cheval n'a pas fait l'objet d'une publication particulière. Cependant les précautions soulevées dans le chapitre sur l'utilisation des fluoroquinolones en général en médecine équine doivent s'appliquer.

1.2.5 Choix de la marbofloxacin pour une étude de pharmacocinétique de population.

Afin de mieux utiliser les fluoroquinolones en médecine équine, une étude de pharmacocinétique de population s'imposait pour améliorer les schémas thérapeutiques existants afin de limiter les risques d'apparition de résistance bactérienne et pour augmenter les chances de succès thérapeutiques. Deux molécules largement utilisées chez les chevaux pouvaient alors être choisies pour en faire l'objet : l'enrofloxacin (Baytril®) et la marbofloxacin (Zenequin® ou Marbocyl®). Plusieurs propriétés avantageuses, nous ont orienté vers la marbofloxacin :

- En terme de pharmacocinétique : la marbofloxacin démontre, d'après les études classiques de pharmacocinétique [6, 7], une tendance à une moins grande variabilité de l'ASC que l'enrofloxacin, en particulier avec une administration orale (cf. 1.1.6).
- En terme de pharmacodynamie : la marbofloxacin exerce une activité importante chez des pathogènes majeurs du cheval (bactéries Gram-négatif, en particulier *E.coli*). Même s'il n'est pas rapporté d'augmentation de la résistance bactérienne aux fluoroquinolones pour les prélèvements bactériens d'origine équine, une augmentation a par contre été observée pour des souches d'origine canine de manière plus importante pour l'enrofloxacin que pour la marbofloxacin (cf. 1.2.2.2).
- En terme de toxicité, il n'est pas rapporté dans la littérature de cas de pathologies articulaires liées à l'utilisation de la marbofloxacin alors que l'enrofloxacin a déjà été mise en cause (cf. 1.1.8 et 1.1.9).

Par opposition, l'absence de forme commerciale homologuée de la marbofloxacin sous forme injectable au Canada, et plus généralement en Amérique du Nord, représentait une limitation pour la portée de l'étude de cette molécule.

2. Pharmacocinétique de population

2.1 Définition et bases théoriques

Toute thérapeutique a pour but d'obtenir un effet pharmacologique favorable au patient, tout en limitant l'apparition d'effets indésirables ou toxiques, ainsi que, pour la médecine vétérinaire des animaux de consommation, ne pas atteindre des concentrations en résidus au dessus de la tolérance admise pour les aliments d'origine animale. Les processus qui contrôlent la pharmacocinétique et la pharmacologie d'un principe actif sont largement sous la dépendance des mécanismes physiopathologiques du patient, ce qui entraîne de la variation dans la réponse au médicament. On comprend alors l'intérêt de l'étude des variations observées pour permettre de mieux les contrôler. La pharmacocinétique de population est l'étude des paramètres de pharmacocinétique d'un principe actif en prenant en compte les effets physiopathologiques et permet de déterminer les sources de variabilité intra et interindividuelles[122].

2.1.1 Approche traditionnelle (« standard two stage », STS)

L'approche traditionnelle pour les études de pharmacocinétique consiste à composer un groupe homogène d'individus (classiquement 6-30 patients pour les études en médecine humaine, 5-6 sujets pour celles sur les chevaux), d'administrer le principe actif et de faire des prélèvements nombreux et à horaires déterminés afin d'obtenir des données en nombre important pour chaque individu[122]. L'analyse des données récoltées se fait en 2 temps. Tout d'abord, les paramètres de chaque individu sont estimés avec des méthodes d'ajustement de courbe (« curve fitting ») par exemple par régression non linéaire. Dans un second temps, les paramètres individuels sont rassemblés pour calculer des estimés de tendance centrale (moyenne, médiane, mode ...) et de dispersion (écart-type, quantiles...)[122, 123].

Ce type d'étude, le plus répandu, implique plusieurs limitations. Premièrement, on utilise un petit groupe d'individus homogènes dans un environnement contrôlé. Hors ce groupe

et les conditions expérimentales ne représentent pas forcément de manière réaliste la population entière et les conditions d'utilisation future en clinique. Si l'on décide d'étudier la pharmacocinétique du principe actif avec cette méthode sur des patients atteints de pathologies, il faudra respecter quand même des conditions d'homogénéité des patients (problème lors de maladies rares) et faire des prélèvements assez nombreux ce qui peut poser des problèmes d'éthique (patients très âgés, gravement malades, pédiatrie). Deuxièmement, une autre limite majeure de ce type d'expérimentation est le problème de l'étude de la variabilité puisque la variabilité intra-individuelle et la variabilité inter-individuelle sont rassemblées sous un même terme sans qu'il soit possible de les distinguer. Ainsi, des problèmes peuvent apparaître lorsqu'on voudra faire de l'inférence statistique comme des intervalles de confiance très larges. Troisièmement, ces études sont assez coûteuses en terme de temps, de conditions expérimentales (respect des « bonnes pratiques de laboratoire », environnement contrôlé...), et du nombre de prélèvements à analyser pour déterminer les concentrations[122-125].

Par contre, les avantages d'une telle méthode sont sa nature expérimentale (beaucoup de biais sont contrôlés), et sa reconnaissance par les administrations chargés d'homologuer les nouveaux médicaments[122, 123].

2.1.2 Approche populationnelle vraie

Par opposition à l'approche traditionnelle, l'approche populationnelle permet une évaluation beaucoup plus détaillée de la variabilité dans le comportement d'un principe actif. On pourra distinguer la part de variabilité dite biologique, due à des variables physiopathologiques, démographiques, environnementale et la part de variabilité statistique, elle-même scindée en variabilité intra-individuelle et variabilité inter-individuelle[123, 125].

L'approche populationnelle utilise des méthodes statistiques évoluées pour permettre l'estimation des paramètres de la population en utilisant des données peu nombreuses (de 1 à 5 points en général) pour chaque individu mais sur un nombre important d'individus, ce qui permet de mieux refléter la population dans son ensemble qu'un groupe de 5 à 30

personnes des études traditionnelles (STS)[125]. La quantification de la variabilité permet de faire de l'inférence statistique dans de meilleures conditions[123, 125].

2.1.2.1 Étude des sources de variabilité

2.1.2.1.1 Variabilité biologique

Des essais cliniques permettent d'établir des corrélations entre les variations observées de la réponse clinique ou les paramètres pharmacocinétiques d'un principe actif et différentes variables « biologiques » telles que l'âge, le poids et/ou la race[125]. On obtient alors les paramètres de ces effets en terme de modification sur la réponse moyenne dans la population[125]. On pourra ainsi déterminer un dosage optimal pour la sous-population cible. Mais il faut également obtenir la variabilité de ces paramètres pour permettre l'estimation de la fourchette de réponse que l'on s'attend à observer avec tel ou tel schéma posologique[123, 125]. Les covariables les plus étudiées sont présentées dans ce chapitre.

- Variabilité physiologique

La majorité des paramètres pharmacocinétiques sont corrélés au poids corporel, en particuliers le volume de distribution ou la clairance[126, 127]. L'âge du patient a une influence sur la distribution et l'élimination du médicament, les effets les plus significatifs s'observent sur les très jeunes individus et en gériatrie[125]. Chez les jeunes, le métabolisme et l'excrétion rénale peuvent être diminués à cause de l'immaturité des organes. Un rapport eau extracellulaire/eau intracellulaire différent et une liaison aux protéines plasmatiques modifiée expliquent un volume de distribution souvent plus large que celui des individus matures[128]. Par exemple, dans le domaine vétérinaire, le volume de distribution de la gentamicine est plus grand chez les poulains que pour des juments, respectivement 0.39 L/kg à 10 jours après la naissance et 0.17 L/kg pour les adultes[128]. Chez les individus âgés, des modifications dans le pourcentage de graisse corporelle, une diminution de la capacité d'excrétion rénale et un débit cardiaque plus faible affectent le devenir des principes actifs. Les effets du genre sont le plus souvent négligeables par

rapport aux autres covariables mais quelques exceptions existent comme les principes actifs qui se fixent sur les protéines de liaisons aux hormones de la reproduction[129]. Dans ce dernier cas, les profils pharmacocinétiques seront très spécifiques au genre. Le métabolisme est affecté par la génétique de chaque individu : on observe des cinétiques enzymatiques différentes pour certaines drogues. Ces effets sont encore peu étudiés en thérapeutique vétérinaire mais en médecine humaine on pourra distinguer différents profils de métabolisme entre les patients (par exemple, individus à métabolisme de la succinylcholine rapide ou lent, acétylateurs rapides ou lents ...)[130]. En médecine vétérinaire, des différences entre races au sein d'une même espèce sont possibles[130].

- Variabilité due à une maladie

Un processus morbide va affecter le profil pharmacologique d'un principe actif de manière importante et complexe car différents processus physiopathologiques peuvent être impliqués[131]. Il en résulte une plus grande variabilité que chez les sujets sains. Par exemple, dans une étude de pharmacocinétique de la ciprofloxacine administrée par voie orale chez des patients humains septicémiques, la variabilité de l'ASC cinq jours après le début du traitement est très importante (figure 7)[132].

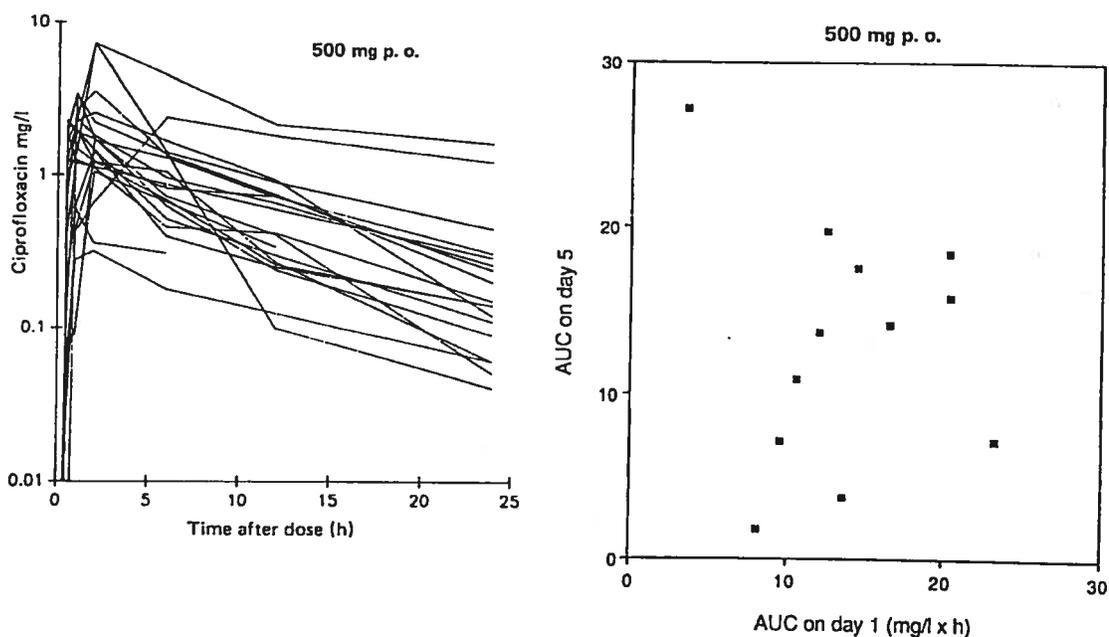


Figure 7: Variabilité de la pharmacocinétique de la ciprofloxacine administrée par voie orale chez des patients humains septicémiques[132]. A gauche : évolution des concentrations plasmatiques en ciprofloxacine en fonction du temps après une dose de 500 mg par voie orale. A droite : Comparaison des ASC au jour 1 et au jour 5 du traitement.

En médecine vétérinaire, des exemples de modifications des paramètres pharmacologiques avec la maladie, bien que moins nombreux, sont également décrits [110, 131, 133-137]. Dans une étude de pharmacocinétique de l'imidocarb chez les caprins, la présence de fièvre est associée à des modifications significatives dans le volume de distribution et la clairance[133]. Dans cette étude, l'origine de la fièvre avait une importance notable puisque selon que la fièvre était déclenchée par injection d'endotoxine ou par infection par un trypanosome, les modifications variaient (figure 8)[133]. Plus que la réaction fébrile elle-même, c'est l'ensemble du processus physiopathologique qui doit être pris en compte.

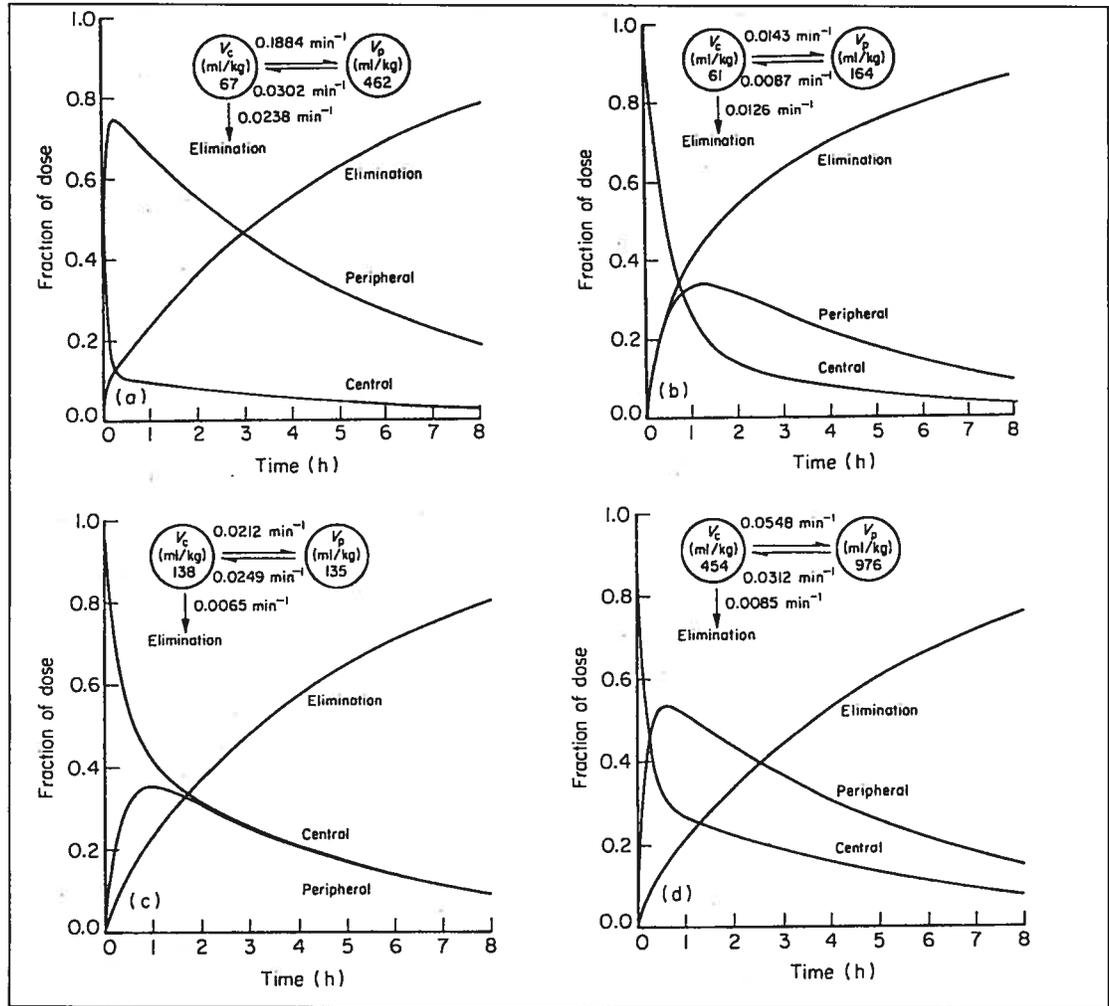


Figure 8 : courbes des concentrations (en fraction de dose) en Imidocarb et estimations des paramètres pharmacocinétiques après injection intraveineuse à des chèvres ayant différents statuts physiopathologiques. a : normal ; b : fièvre induite par endotoxine d'*E. coli* ; c : fièvre induite par infection avec le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine; d : fièvre induite par infection avec *Trypanosoma evansi*. D'après [133].

L'importance du processus physiopathologique est également reprise dans un étude chez le porc [138]. Les effets sur les paramètres de pharmacocinétique de l'enrofloxaciné causés par l'injection d'endotoxine bactérienne et de dexaméthasone sont décrits et comparés aux effets associés à un modèle de pleuropneumonie à *Actinobacillus pleuropneumoniae*. L'administration de LPS est associée à une diminution de la clairance tandis que le volume de distribution à l'équilibre est augmenté chez les animaux ayant reçu de la dexaméthasone. Ces résultats diffèrent de ceux observés avec le modèle d'infection bactérienne. Dans une autre étude[137], les paramètres pharmacocinétiques de l'enrofloxaciné chez les porcins sont très différents selon que le porcelet soit sain ou malade lors du traitement (tableau VII). Un porcelet malade a une clairance et un volume de distribution plus faibles, ayant pour conséquences une AUC plus grande. Également, par voie intramusculaire, l'absorption est retardée avec un Tmax de 1.12h pour les porcelets sains et 1.98h pour les malades.

Tableau VII : paramètres de la pharmacocinétique de l'enrofloxaciné chez les porcelets par voie intraveineuse.(adapté de [137]).* : différence significative avec $p < 0.05$;

paramètres	sains	malades
ASC (mg/L/h)	5.97 (0.66)	18.16 (4.49)*
Vd _{area} (L/kg)	3.34 (0.69)	2.81 (1.06)
Clairance (L/kg/h)	0.42 (0.04)	0.15 (.04)*

Chez les caprins, la fièvre induite par des endotoxines bactériennes modifie significativement les paramètres de la pharmacocinétique de la marbofloxaciné : le volume de distribution est réduit et la clairance diminue chez les animaux fébriles, d'où une augmentation de l'aire sous la courbe des concentrations (tableau VIII) [139].

Tableau VIII : paramètres de la pharmacocinétique de la marbofloxacin (2 mg/kg) chez des chèvres saines et fébriles[139].

	Sains	Fébriles
V _{ss} (L/kg)	1.19	0.72
Cl (L/kg/h)	0.24	0.13
ASC (µg h/mL)	9.69	18.45
MRT (h)	5.28	6.09

Enfin, il ne faut pas oublier que la maladie peut affecter la réponse moyenne mais aussi la variabilité de la réponse. Par exemple, il est montré que la variabilité interindividuelle de la clairance est beaucoup plus importante chez les animaux malades que chez les animaux sains (figure 9).

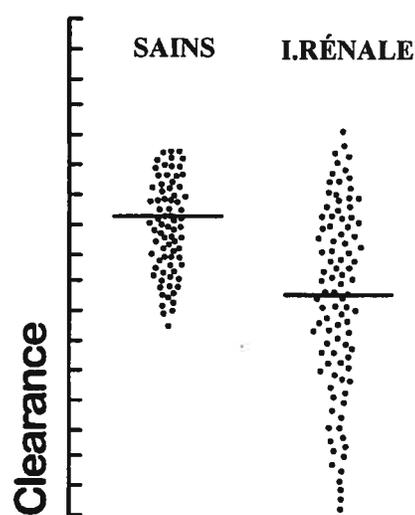


Figure 9 : schématisation de la variabilité de la clairance selon le statut physiopathologique de l'animal sur une échelle arbitraire. (Animaux sains à gauche, et atteints d'insuffisance rénale à droite). D'après [140]

2.1.2.1.2 Variabilité statistique

La variabilité statistique est constituée par tout ce qui n'est pas quantifiable de manière fixe et représente le degré d'incertitude associé à différentes variables et paramètres de la modélisation des valeurs observées[123, 125]. La variabilité statistique est décrite en terme d'effets aléatoires qui sont de 2 types :

- les effets aléatoires intra-individuels ou résiduels. Ils représentent l'écart entre la valeur prédite et la valeur réellement observée (erreur de dosage, erreur dans la modélisation...)
- les effets aléatoires inter-individuels. Ils représentent la dispersion des valeurs autour d'une moyenne.

La connaissance des paramètres de ces effets aléatoires est indispensable pour faire de l'inférence statistique (intervalle de confiance, intervalle de prédiction...) à partir du modèle[123, 125]. Une représentation schématique de la distribution de probabilité des effets aléatoires est donnée figure 10.

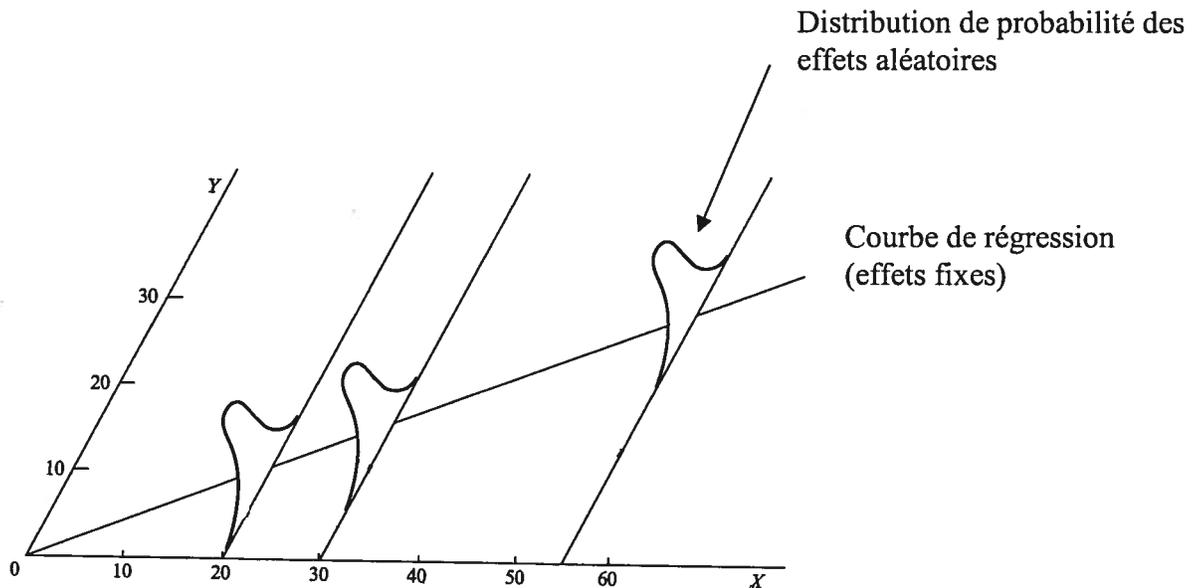


Figure 10 : représentation schématique des distributions de probabilité d'une réponse Y en fonction d'une variable X.

2.1.2.2 Les modèles pharmaco-statistiques

Deux grands types d'analyses de données en pharmacocinétique de population existent : les méthodes paramétriques, qui supposent un certains nombreux d'assomptions sur les données, et les méthodes non-paramétriques, qui permettent de ne pas avoir de restrictions quant à la distribution des termes d'erreurs aléatoires dans les modèles[122, 123]. Les méthodes paramétriques sont plus faciles à mettre en œuvre mais ne peuvent pas prendre en charge des distributions non normales dans les paramètres pharmacocinétiques [123].

2.1.2.2.1 Méthodes paramétriques

Dans les méthodes paramétriques, la distribution de probabilité des paramètres pharmacocinétiques est assumée comme étant connue (normale ou log-normale). Les intervalles de confiances et les erreurs-types sont estimés avec des méthodes paramétriques également[123].

La méthode la plus répandue est NONMEM (Nonlinear Mixed-effects Modeling). Un modèle pharmacostatistique complet est créé puis les paramètres sont ajustés aux données par la méthode des moindres carrée étendue[123]. Le modèle pharmacostatistique est composé d'un modèle pharmacocinétique, qui représente les effets fixes, et d'un modèle statistique qui représente les effets aléatoires [122, 123](figure 11). Le modèle pharmacocinétique peut être subdivisé en modèle structurel, qui associe la concentration (variable dépendante) à des paramètres de la pharmacocinétique (clairance, volume de distribution, dose), et en un modèle de régression qui estime ces paramètres pharmacocinétiques par détermination de covariables. Ce modèle représente les effets fixes et ne s'intéresse donc pas aux termes d'erreur[122, 123](figure 11).

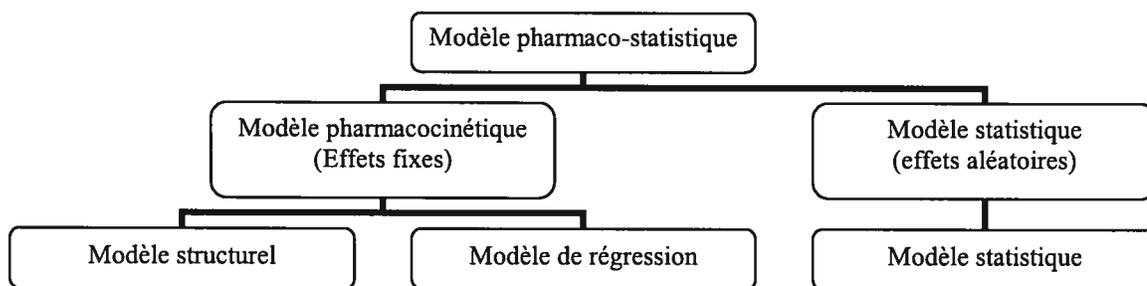


Figure 11. Schéma de la construction d'un modèle pharmacostatistique, d'après [123]. Les modèles structurel et de régression ne comportent que des effets fixes. Le modèle statistique ajoute les effets aléatoires (interindividuels et résiduels).

A des fin d'explication et pour la suite, nous prendrons l'exemple de la pharmacocinétique de population de la levofloxacin chez des humains avec des infections graves[1].

Modèle structurel de la levofloxacin[1]

Le modèle le plus approprié pour la levofloxacin selon le critère d'Akaike est un modèle PK à deux compartiments. L'évolution des concentrations en antibiotique dans le compartiment central suit alors une équation du type :

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad \text{avec} \quad \alpha + \beta = k_{cp} + k_{pc} + Cl/V_c$$

$$\alpha * \beta = k_{pc} * Cl/V_c$$

k_{cp} : microconstante de diffusion du compartiment central vers le compartiment périphérique. k_{pc} : microconstante de diffusion du compartiment périphérique vers le compartiment central. Cl : clairance totale. V_c : volume du compartiment central.

Chaque paramètre du modèle structurel peut être estimé avec l'utilisation de méthode de régression avec covariables[122, 123]. On peut alors déterminer des équations de la forme :

$$\text{PAR} = \theta_1 + \theta_2 * \text{cov}_1 + \theta_3 * \text{cov}_3 + \dots + \theta_n * \text{cov}_{n-1}$$

Avec PAR : valeur moyenne du paramètre, cov_i = covariable i , θ_i : coefficient de la covariable i qui évalue l'intensité de la corrélation entre le paramètre PAR et cette covariable.

Modèle régression de la levofloxacin[1]

Dans l'exemple, 4 paramètres ont subis une analyse de covariance : la clairance, le volume du compartiment central et le microconstante.

$$\text{Cl} = 5.945 + 0.070 \text{ Cl}_{\text{CR}} + \text{type racial}$$

avec	type racial		- 1.496 si caucasien
			- 0.484 si afro-américain
			- 3.167 si hispanique
			5.137 si autres

Le même type de régression est donné dans l'article de référence pour les autres paramètres du modèle structurel.

L'ensemble des effets aléatoires est traité dans le modèle statistique[122, 123]. Deux types d'effets sont pris en compte. Premièrement, l'effet aléatoire interindividuel qui représente les écarts observés entre les paramètres pharmacocinétique calculés pour un individu et les valeurs moyennes de la population. Cet effet est souvent représenté par η et suit une distribution de probabilité supposée normal ou log-normal avec la méthode paramétrique de NONMEM. On peut donc mettre en équation la clairance de l'individu j en ces termes :

$$\text{Clairance}_j = \text{Clairance}_{\text{moyenne}} + \eta_{\text{Cl}j}$$

Avec $\eta_{\text{Cl}j}$ qui a une valeur moyenne de 0 et une variance de ω^2

Deuxièmement, le modèle statistique ajoute un effet aléatoire intraindividuelle ou résiduel qui représente toute les erreurs non encore prises en charge (modèle structurel pas tout à fait adéquat, erreurs de mesures dans les concentrations, les variations des paramètres pharmacocinétiques pour un même individu au cours du temps...)[122, 123]. Il est

symbolisé par l'écart entre la valeur observée et la valeur calculée grâce au modèle. Par exemple, la clairance de l'individu j au temps i peut s'écrire mathématiquement :

$$\text{Clairance}_{ij} = \text{Clairance}_{ij \text{ réel}} + \varepsilon_{ij}$$

Avec ε_{ij} l'erreur résiduelle supposé de moyenne 0 et de variance σ^2

2.1.2.2 Méthodes non-paramétriques

Les méthodes non-paramétriques permettent d'analyser les données sans faire de supposition sur la distribution de probabilité des effets aléatoires au contraire des méthodes paramétriques. Elles peuvent permettre la mise en évidence de distributions multimodales pouvant être reliées à la présence de groupes de patient avec des paramètres homogènes mais différents de ceux de la majorité[122, 123]. Les techniques statistiques utilisées dérivent de la méthode de l'estimation par maximum de vraisemblance (Maximum likelihood estimation)[122, 123]. Plusieurs programmes et algorithmes existent : NPML (Nonparametric Maximum Likelihood), NPEM (Nonparametric Expectation Maximization)...[122, 125]

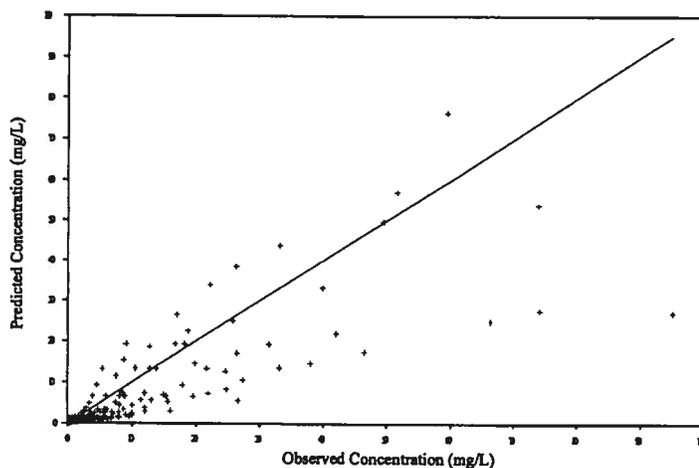
Les méthodes semi-paramétriques sont un intermédiaire entre méthodes paramétriques et non-paramétriques : l'estimation des paramètres n'est pas limité à un modèle structurel particulier mais les termes de variabilité sont calculés selon les méthodes paramétriques[122, 123].

2.1.2.3 Validation des résultats

Après l'établissement des paramètres du modèle pharmacostatistique, il est important de s'assurer que les résultats peuvent s'extrapoler à l'ensemble de la population, tout particulièrement lorsque le but du modèle est l'ajustement de posologie[123, 125]. Deux types de validations sont possibles mais elles répondent à la même logique : utiliser des données qui n'ont par servi à l'établissement du modèle pour s'assurer que le modèle soit juste[123]. La validation dite « externe » utilise des données totalement nouvelles, par

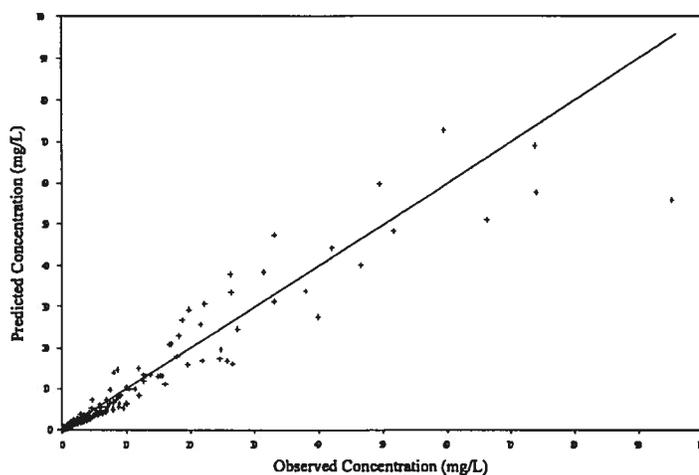
exemple d'une autre étude, tandis que la validation interne utilise des données provenant d'un rééchantillonnage des données déjà utilisées[123].

On estime la performance du modèle avec des indicateurs estimant la précision des variables prédites ou par approche graphique[123]. Pour cette dernière, on compare la variable d'intérêt prédite, souvent la concentration, avec sa valeur observée. La répartition des points donne une idée du bon ajustement : plus les points seront rapprochés de la ligne concentration observée = concentration prévue, plus le modèle est bien ajusté (figure 12)



Modèle A :

Les paramètres de la pharmacocinétique sont proportionnels au poids.



Modèle B :

$$\begin{aligned} \text{Clairance} &= P^{0.57} \\ V_c &= 0.496 P^{0.813} \\ V_{ss} &= 2.37 P^{0.828} \end{aligned}$$

P = poids corporel
 V_c = volume du compartiment central
 V_{ss} = volume à l'état d'équilibre

Figure 12 : diagramme de dispersion des valeurs prédites en fonction des valeurs observées des concentrations d'oxytétracycline dans deux modèles de pharmacocinétique de population. Les modèles sont inscrits à la droite de chaque graphique. On remarque que la dispersion des points est moindre pour le graphique du modèle B signifiant un meilleur ajustement du modèle[126].

2.2 Applications

2.2.1 Développement du médicament

L'utilisation d'une approche populationnelle est possible dans plusieurs phases de développement du médicament[125, 141]. Son inclusion dès les phases précoces de développement peut permettre la collecte et l'utilisation de données importantes pour l'homologation de celui-ci et permet également de mieux définir la méthodologie à employer pour des phases de développements ultérieures[141]. Sa contribution potentielle dans une perspective réglementaire fait l'objet de documents officiels tant en Europe qu'en Amérique du Nord.

2.2.1.1 *Phase I : phase précoce*

Dans cette phase de développement, le principe actif est administré dans des conditions expérimentales strictes à des patients sains pour déterminer sa tolérance à court terme et obtenir de premières données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Les données pharmacocinétiques sont obtenues par un suivi extensif du profil des concentrations en fonction du temps tandis que les informations pharmacodynamiques permettent d'établir une relation initiale concentration-effet[141]. Cette phase où l'on obtient beaucoup de données sur relativement peu d'individus répond plus aux besoins d'une approche classique (STS) mais l'approche populationnelle peut amener des compléments d'information tel que confirmation du modèle et mise en évidence de profil pharmacologique déviant du modèle de certains individus[125].

2.2.1.2 Phase IIa : essai clinique exploratoire

Cette phase a pour but d'examiner si la molécule étudiée a l'effet clinique espéré et aide à définir l'intervalle de posologie possible pour son utilisation. L'approche populationnelle permet de mieux appréhender la relation dose-concentration-effet [125]. Les données obtenues permettent dans un premier temps d'estimer les paramètres pharmacocinétiques puis, en combinant l'historique de l'administration du médicament avec les concentrations plasmatiques individuelles, le profil des concentrations peut être calculé pour chaque individu et ainsi permettre de mieux explorer les relations entre l'exposition à la molécule avec l'efficacité thérapeutique ou des effets toxiques[125].

2.2.1.3 Phase IIb et III : essais cliniques

Ces essais cliniques ont pour but de confirmer l'efficacité du médicament. La méthodologie employée sera largement influencée par les données collectées dans les phases précédentes[141].

- Lorsque la variabilité interindividuelle est faible, le but de l'approche populationnelle sera alors de déterminer si pour des patients à risques (exemple : insuffisance rénale) une adaptation de la posologie est nécessaire *a priori*. [122]
- Lorsque la variabilité interindividuelle est forte et qu'une relation forte existe entre concentration et effet, il peut être préférable de randomiser les individus en fonction de la concentration plasmatique plutôt qu'en fonction de la dose. L'approche populationnelle permet alors d'individualiser la posologie pour obtenir les concentrations désirées. Cette approche permet également la détermination de covariables et de dosages spécifiques pour des sous-populations ou des individus[122, 125].

2.2.1.4 Phase III tardive et IV : essais cliniques tardifs

Ces essais ont pour but essentiellement de confirmer le profil de tolérance d'une drogue qui a démontré son efficacité mais elles peuvent également permettre de détailler les caractéristiques pharmacocinétiques d'un principe actif pour des sous-populations qui n'ont pas été incluses dans les essais précédents[122, 125].

2.2.2 Ajustement des posologies

L'approche populationnelle et la modélisation de la pharmacocinétique d'une principe actif par des modèles à effets mixtes (c'est à dire avec des effets fixes et des effets aléatoires) permet d'effectuer des calculs de posologies adaptées au sous-groupe ou à l'individu cible. L'individualisation des posologies peut être encore plus poussée en utilisant des méthodes de décision qui utilisent le calcul des probabilités conditionnelles et en particulier le théorème de Bayes[125].

2.2.2.1 Modélisation interspécifique

La population prise en compte par le modèle pharmacostatistique peut ne pas se limiter à une espèce particulière mais au contraire englober plusieurs espèces animales[126, 127]. Les sous-groupes de population pourront alors représenter une espèce spécifique ou bien un groupe d'animaux plus restreint (par exemple, telle espèce atteint de telle maladie). Deux études[126, 127] présentent un modèle interspécifique à effets mixtes de la pharmacocinétique de 2 antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. Les paramètres pharmacocinétiques sont estimés à partir de variables biologiques (poids corporel, poids du cerveau). La figure 13 présente des exemples de courbes régressions pour la gentamicine[127].

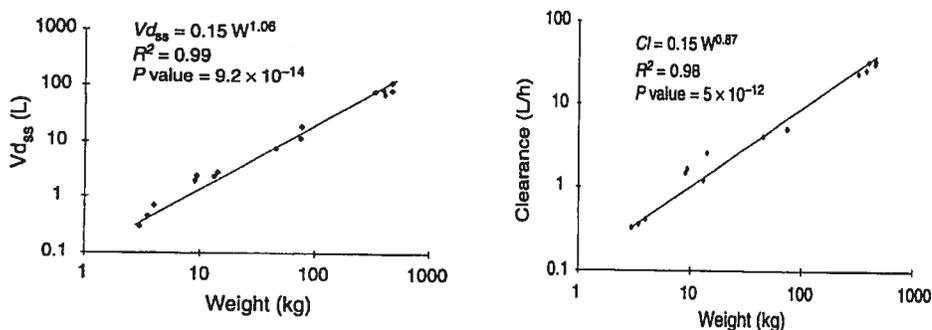


Figure 13 : allométrie de la gentamicine : estimation du volume de distribution (à gauche) et de la clairance (à droite) en fonction du poids corporel[127].

Une fois les paramètres des équations de régression calculés, le modèle peut être vérifié sur une espèce dont les données expérimentales n'ont pas servi à la détermination du modèle. Dans le cas de la gentamicine, les auteurs ont validé leurs résultats par le bon ajustement obtenu entre les données observées et celles prévues chez les porcs[126].

2.2.2.2 Individualisation des posologies et méthodes de prévision bayésienne[142]

En usage clinique[122, 123, 125], les méthodes populationnelles permettent dans un premier temps de proposer un schéma posologique initial ajusté en fonction des covariables de l'individu à soigner (poids corporel, créatinine plasmatique...). Cet ajustement permet, si la variabilité de la réponse pharmacodynamique n'est pas trop grande, de définir des posologies pour des sous-groupes avec des covariables particulières. C'est en particuliers vrai pour des sous-groupes qui ont des paramètres pharmacocinétiques qui sont vraisemblablement différents de la moyenne populationnelle : individus très âgées ou très jeunes, individus avec insuffisance rénale ou hépatique par exemple. En médecine des animaux de production, on peut imaginer appliquer ces techniques pour déterminer des dosages adaptés à des groupes d'animaux ayant des covariables identiques ou proches : stade de lactation, âge, alimentation, race...

Dans un second temps, on peut aller plus loin dans l'ajustement individuel en utilisant des méthodes de prévision dites « Bayésiennes »[122, 125, 142]. Le rôle de l'ajustement bayésien est de fournir au prescripteur un modèle spécifique pour chaque individu à partir des données déjà connues des concentrations plasmatiques de cet individu, du dosage utilisé et des autres covariables observées (créatinine plasmatique, poids corporel...). Les données de l'individu sont traitées de manière à ajuster le modèle pour améliorer la prédiction des concentrations plasmatiques futures. Ainsi les données passées, qui sont incorporées dans le modèle, sont associées aux données présentes, actuelles, du patient à soigner, pour permettre la meilleure prédiction possible des données futures. Des programmes informatiques variés permettent ces calculs et sont à la disposition des prescripteurs en médecine humaine[142].

2.2.3 Calcul de temps d'attente

En médecine des animaux de consommation, le vétérinaire doit toujours avoir à l'esprit la question des temps d'attente (temps pendant lequel les concentrations tissulaires en principe actif sont supérieures à une limite fixée). Les temps d'attente sont calculés lors d'utilisation dans le cadre strict de l'homologation. Or, le vétérinaire peut être amené à prescrire hors de ce cadre, les animaux auront alors possiblement des paramètres pharmacocinétiques modifiées par rapport aux animaux rencontrés dans le cas d'une utilisation homologuée.

La figure 14 montre que, plus qu'une variation dans la dose initiale, une variation dans la pharmacocinétique (par exemple un allongement de la demi-vie) peut avoir des conséquences importantes sur le temps de retrait nécessaire pour retrouver des concentrations tissulaires adéquates[143]. L'approche populationnelle[123] permet de faire correspondre des usages hors-homologation avec des données pharmacocinétiques afin de permettre une approximation des nouveaux temps d'attente. Ces données sont actuellement compilées au sein du gFARAD (Global Food Animal Residue Avoidance Databank) qui est en charge d'aider les prescripteurs à déterminer un temps d'attente adéquat.

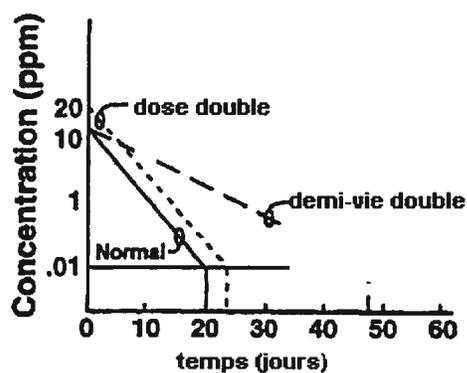


Figure 14 : comparaison entre le temps nécessaire pour obtenir une concentration-cible (par exemple une limite maximale de résidus) et la dose normale, une dose double et une dose normale mais avec un temps de demi-vie double[143].

METHODOLOGIE

1. Animaux

Quarante chevaux provenant du Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) de la Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV, Université de Montréal) et du complexe de bioévaluation de la FMV (Université de Montréal) ont été recrutés pour cette étude, soit 34 juments, quatre hongres et deux mâles de races variées. La médiane de l'âge était de 9 ans, avec des extrêmes de 3 et 27 ans. Sur ces 40 chevaux, 22 étaient cliniquement en bonne santé au moment de l'administration de marbofloxacin et 18 présentaient des signes cliniques de maladies (Tableau IX). Parmi les chevaux « sains » lors de l'examen, certains avaient des antécédents de souffle ; du fait de l'absence de signes cliniques de souffle ou d'infections bactériennes tout au long de l'étude, ces chevaux ont été classés dans la catégorie « sain ». Un examen clinique comprenant un examen physique et une auscultation au sac, ainsi que des analyses hématologiques et biochimiques étaient réalisés sur chaque cheval. L'anamnèse de la maladie et les traitements reçus par l'animal étaient également notés. La régime et l'alimentation de chaque animal variaient avec sa condition clinique. Le consentement du propriétaire et l'accord du clinicien responsable étaient nécessaires pour inclure chaque cheval dans le projet de recherche, qui a été approuvé par le Comité d'Éthique pour l'utilisation des animaux de la FMV.

Tableau IX : État clinique des chevaux lors de l'administration de la marbofloxacin.

Etat clinique	Nombre de chevaux
Sains	22
Pathologies myoarthrosquelettiques	7
Pathologies respiratoires	5
Pathologies digestives	5
Mammite aiguë	1

2. Protocole d'administration et de récolte

Une solution à 10% de marbofloxacin, disponible commercialement sous le nom Marbocyl® injectable (Vétoquinol, Lure, France), a été administrée en bolus rapide à la posologie de 2mg/kg par un cathéter intraveineux mis en place dans la veine jugulaire droite.

Des prélèvements veineux de 10 mL ont été ponctionnés au niveau de la veine jugulaire gauche dans des tubes héparinés pour le dosage des concentrations plasmatiques de marbofloxacin. Les échantillons ont été prélevés juste avant administration de la marbofloxacin, puis dans un intervalle de temps de 30 minutes 1h30, 3h, 5h, 7h et 19h30 après administration. Les temps de prélèvements ont été choisis après étude de données préliminaires pour obtenir une variance minimum dans les valeurs de clairance et d'AUC. Chaque prélèvement a été centrifugé dans l'heure qui a suivi sa réalisation (1400 g, 10 min, 10-12 C), puis a été congelé à -20 C en attendant le dosage plasmatique de la marbofloxacin.

3. Dosage de la marbofloxacin

La marbofloxacin plasmatique a été dosée par une méthode HPLC validée [2]. La limite de quantification était de 0.01µg/mL. Le ratio d'extraction était supérieur à 70%. La répétabilité et la reproductibilité, exprimées sous forme de coefficient de variation, étaient inférieures à 7%.

4. Analyse pharmacostatistique

Une analyse non-compartmentale a permis l'estimation des paramètres de la pharmacocinétique individuelle et de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques entre 0 et 24 h de chacun des chevaux afin de déterminer des valeurs initiales pour les algorithmes utilisés par la suite. Les données ont ensuite été analysées en utilisant des modèles non linéaires de régression à effets mixtes avec le logiciel WinNonMix® (Pharsight). La méthode des moindres carrés a été utilisée avec un algorithme simplex pour estimer les valeurs des effets fixes et aléatoires.

4.1 **Modèle structurel**

La pharmacocinétique de la marbofloxacin a été décrite chez le cheval par des modèles à deux et trois compartiments [6, 7]. Cependant la première phase du modèle à trois compartiments étant très courte et contribuant très peu au calcul de l'ASC et de la clairance systémique, il a été décidé d'utiliser un modèle structurel à deux compartiments avec une élimination de premier ordre. L'équation du modèle structurel est donc de la forme :

$$(Eq 1) \quad C_p = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

Avec A et B étant respectivement les interceptes de la première et de la deuxième phase de l'équation bi-exponentielle des concentrations plasmatiques en fonction du temps. α et β sont les constantes de vitesse de ces mêmes phases.

Le modèle a été paramétré en terme de clairance systémique (Cl), clairance de distribution inter-compartmentale (Cl_d), volume du compartiment central (V₁) et volume du compartiment périphérique (V₂).

4.2 Modèle de régression

Les modèles de régression ont pour but d'étudier les relations possibles entre certaines caractéristiques (effets fixes) des chevaux et leur exposition à la marbofloxacin. Les équations de régression générales pour les quatre paramètres pharmacocinétiques sont :

$$(Eq. 2) \quad \ln Cl_i = \theta_{Cl,1} + \theta_{Cl,2} \cdot cov_1 + \theta_{Cl,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{Cl,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{Cl_i}$$

$$(Eq.3) \quad \ln Cl_{di} = \theta_{Cl_d,1} + \theta_{Cl_d,2} \cdot cov_1 + \theta_{Cl_d,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{Cl_d,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{Cl_{di}}$$

$$(Eq.4) \quad \ln V1_i = \theta_{V1,1} + \theta_{V1,2} \cdot cov_1 + \theta_{V1,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{V1,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{V1_i}$$

$$(Eq.5) \quad \ln V2_i = \theta_{V2,1} + \theta_{V2,2} \cdot cov_1 + \theta_{V2,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{V2,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{V2_i}$$

Avec Cl_i , Cl_{di} , $V1_i$ et $V2_i$ étant respectivement la clairance, la clairance de distribution, le volume du compartiment central et le volume du compartiment périphérique du cheval i . $cov_{1...n}$ sont les covariables (effets fixes) associées au paramètre pharmacocinétique. $\theta_{1...n}$ sont des constantes ou des constantes de proportionnalité qui quantifient l'influence d'une covariable sur un paramètre pharmacocinétique. η_{Cl_i} , $\eta_{Cl_{di}}$, η_{V1_i} et η_{V2_i} sont des variables aléatoires normalement distribuées d'espérance nulle et de variance ω_{Cl}^2 , $\omega_{Cl_d}^2$, ω_{V1}^2 et ω_{V2}^2 estimées par le logiciel et représentant la variabilité interindividuelle.

Des analyses préliminaires ayant montré que la variance interindividuelle et intraindividuelle étaient mieux décrites par un modèle de variance proportionnelle à une puissance de la concentration, la variance a été décrite par la suite comme une fonction de la concentration plasmatique au carré. Les paramètres pharmacocinétiques ont été considérés indépendants, rendant leur covariance nulle.

Les modèles de régression ont été construits en utilisant une procédure par ajout successif de covariables (« stepwise forward ») en testant à chaque fois si elle était significative. Un test de ratio de vraisemblance était utilisé pour comparer les modèles et la covariable

d'intérêt était testée avec une Loi de Student. Une valeur de p inférieure à 0.01 était considérée comme significative. Les covariables testées étaient de trois catégories :

1. variables démographiques : race, poids, âge, sexe
2. variables physiologiques :
 - a. niveau d'activité du cheval : repos, entraînement, compétition ;
 - b. données hématologiques : hémocrite, fibrinogène ;
 - c. données biochimiques : glucose, urée, créatinine, bilirubine, AST, phosphatase alcaline, gamma-glutamyl-tansférases, créatine kinase, protéines totales plasmatiques, albumine, calcium, phosphore, sodium, potassium et chlorure plasmatiques ;
3. variables reliées à la maladie :
 - a. température rectale ;
 - b. statut clinique lors de l'injection (sains ou malades) ;
 - c. type de maladie
 - d. administration de médicaments avant injection de marbofloxacin ;
 - e. administration de médicaments dans la période de récolte des prélèvements.

Enfin, l'équation du profil des concentrations en fonction du temps a été décrit sous la forme de l'équation :

$$(Eq.6) \quad C_{p_{ij}} = E\{C_{p_{ij}}\} \cdot (1 + \varepsilon_{ij})$$

Avec $C_{p_{ij}}$ étant la concentration plasmatique observée pour le cheval i au temps j . $E(C_{p_{ij}})$ est la valeur attendue de la concentration plasmatique pour le cheval i au temps j . ε_{ij} est une variable aléatoire normalement distribuée d'espérance nulle et de variance σ^2 et représente la variabilité résiduelle (ou intraindividuelle).

5. Exposition à la marbofloxacine et indices prédictifs de l'efficacité

L'exposition à la marbofloxacin a été évaluée avec l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps (ASC), calculée avec l'équation :

$$(Eq. 7) \quad ASC = \frac{Dose}{Cl}$$

Afin d'estimer les conséquences des variations de l'ASC sur l'efficacité des traitements antibiotiques avec la marbofloxacin, le ratio ASC/CMI a été utilisé comme indice prédictif du succès thérapeutique. Deux CMI ont été utilisées : la valeur de la CMI_{90%} des *Enterobacteriaceae* (0.027 µg/mL) [6] et la valeur de CMI utilisée par la NCCLS [144] pour distinguer les bactéries dites sensibles des bactéries dites de sensibilité intermédiaires (0.1 µg/mL). Un ratio inférieur à 60 a été considéré comme une prévision d'avoir une faible probabilité de guérison tandis qu'un ratio supérieur à 125 a été considéré comme prédictif de fortes chances de succès thérapeutique.

ARTICLE

L'article ci-après intitulé « Population pharmacokinetics of marbofloxacin in horses : preliminary analysis » a été soumis pour publication dans la revue : Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.

POPULATION PHARMACOKINETICS OF MARBOFLOXACIN IN HORSES: PRELIMINARY ANALYSIS.

M. PEYROU*
M.Y. DOUCET*
A. VRINS**
D. CONCORDET***
M. SCHNEIDER****
A. BOUSQUET-MELOU***

* : Département de biomédecine vétérinaire. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal. CP 5000. St-Hyacinthe, QC. J2S 7C6 Canada.

** : Département des Sciences cliniques. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal. CP 5000. St-Hyacinthe, QC. J2S 7C6 Canada.

*** : UMR de Physiopathologie et Toxicologie Expérimentales, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse cedex 03, France.

**** : Vétquinol, Magny-Vernois, B.P. 189, 70204 Lure cedex, France.

Corresponding author:

Dr. Michèle DOUCET
Département de biomédecine vétérinaire.
Faculté de médecine vétérinaire.
CP 5000
St-Hyacinthe, QC J2S 7C6
Canada
michele.doucet@umontreal.ca

SHORT RUNNING TITLE: PopPK marbofloxacin in horses

ABSTRACT

Population pharmacokinetics of marbofloxacin were investigated on 21 healthy and 16 diseased horses to assess interindividual variability of exposure. Demographic, physiologic and disease covariables were tested using mixed effects models. As a preliminary analysis, this study has demonstrated that none of the tested covariables were significant in regression models of compartmental volumes or distribution clearance, but the clinical status of the horse (healthy/diseased) was a significant covariable ($p < 0.01$) for systemic clearance. Clearance had a lower mean and a higher variance for diseased horses than healthy horses, with respectively a mean of 0.209 and 0.284 L/h/kg and a coefficient of variation of 52% and 15%. Consequently, variability of AUC was higher in diseased horses. Considering an AUC/MIC ratio below 60 as a prediction of poor efficacy, a dosage regimen of 2 mg/kg intravenous was deemed to be inadequate for 19% of diseased horses if the MIC of the bacteria was 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (sensitivity breakpoint). However 93% of diseased horses could achieve a ratio above 125, predicting a very good efficacy, for the MIC_{90} of *Enterobacteriaceae* (0.027 $\mu\text{g/mL}$).

INTRODUCTION

Marbofloxacin is a fluoroquinolone antimicrobial drug, developed for veterinary use, which is approved for use in dogs and cattle in various countries (Schneider *et al.*, 1996). Fluoroquinolones are broad-spectrum antibiotics, expected to be effective on Gram-negative and some Gram-positive bacteria (Spreng *et al.*, 1995; Brown, 1996). For this class of antimicrobials, drug exposure, as measured by the area under the plasma concentration versus time curve (AUC), has been used to calculate surrogate efficacy indices, such as the AUC/MIC ratio, where MIC stands for the minimal inhibiting concentration *in vitro* of the bacteria involved (Hyatt *et al.*, 1995). Thus, variations of drug exposure can be associated with variations in the probability of a successful outcome with a specific dosage regimen. As disease state has been linked to variations of pharmacokinetic (PK) parameters of some drugs (Baggot, 1980; Rodvold & Neuhauser, 2001), knowledge of the effects of disease are useful to precisely predict how an antimicrobial drug will be effective in a given clinical case. The pharmacokinetics of marbofloxacin have been recently detailed for healthy horses in two studies (Bousquet-Melou *et al.*, 2002; Carretero *et al.*, 2002), but no data have been published for diseased horses to date.

The present study objective was to assess inter-individual variability of exposure to marbofloxacin, as measured by AUC, among healthy and diseased horses in a clinical environment, using population pharmacokinetics analysis, and to correlate exposure with clinical characteristics in these horses.

MATERIALS AND METHODS

Animals and sampling

Forty horses (34 mares, 4 geldings and 2 stallions) of various breeds weighing 383 to 686 kg were used in this study. Median age of the study population was 9 years, with a range of 3 to 27 years. Twenty-two healthy animals were provided by an experimental farm (Centre de Bioévaluation, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal). Eighteen horses with various pathologies, and for which fluoroquinolone administration was indicated, were obtained from the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) of the Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV), Université de Montréal. Seven horses had musculoskeletal disorders, five had respiratory disease, five had digestive disease and one mare had an acute mastitis. All horses underwent a complete physical examination, haematology and plasma biochemistry analysis. A history of each diseased horse was recorded, including concurrent treatments with marbofloxacin administration. The research protocol was approved by the Animal Care Committee of the FMV, in accordance with the Canadian Council on Animal Care Guidelines.

The horses were injected with 2 mg/kg bwt of marbofloxacin (Marbocyl injectable®, Vétoquinol, France) in the right jugular vein via a catheter. Blood samples (10 mL) were collected into heparinised tubes by direct venipuncture of the left jugular vein and centrifuged within 1 hour (1400 g, 10 min, 10-12°C). The plasma was stored at -20°C until assayed. A preliminary analysis on previously published data (Bousquet-Melou *et al.*, 2002) was performed to choose the best sampling plan in order to minimize variance of the AUC. Therefore, blood samples were collected just before injection and within a 30 min interval around 1h30, 3h, 5h, 7h and 19h30 after administration.

Marbofloxacin assay

Plasma marbofloxacin concentrations were measured using a validated HPLC method (Schneider *et al.*, 1996). The limit of quantification was 0.01 µg/mL. The extraction recoveries exceeded 70%. The repeatability and reproducibility, based on the coefficients of variation, were below 7%.

Pharmacokinetic analysis

All concentration-time data were analysed simultaneously by applying a non-linear mixed effects regression model as implemented by use of a software package (WinNonMix, Pharsight). General least squares method with simplex algorithm was used to estimate fixed and random-effect parameters.

Structural model

Pharmacokinetics of marbofloxacin on healthy horses have been previously described as two (Carretero *et al.*, 2002) or three (Bousquet-Melou *et al.*, 2002) compartments models. Since the first phase in the three compartments model was very short and contributed very little to the clearance value and the AUC, it was decided to use a two-compartment pharmacokinetic model with instantaneous bolus input and first order elimination to assess marbofloxacin exposure. The structural model predicting concentration of drugs in the plasma (C_p) can be described as:

$$(Eq\ 1) \quad C_p = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

Where A and B are zero-time intercepts from the first and second phases of the biexponential disposition curve. α and β are the rate constants from the two different phases.

The model was parameterized in terms of systemic clearance (Cl), inter-compartmental distribution clearance (Cl_d), volume of the central compartment (V₁) and volume of the peripheral compartment (V₂).

Regression model

Regression models were developed to examine potential relations between subject clinical characteristics (fixed effects) and exposure to marbofloxacin. Thus, influence of horse variables on values of pharmacokinetic parameters was assessed, using the following general linear regression equations:

$$(Eq. 2) \quad \ln Cl_i = \theta_{Cl,1} + \theta_{Cl,2} \cdot cov_1 + \theta_{Cl,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{Cl,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{Cl_i}$$

$$(Eq.3) \quad \ln Cl_{d_i} = \theta_{Cl_d,1} + \theta_{Cl_d,2} \cdot cov_1 + \theta_{Cl_d,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{Cl_d,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{Cl_{d_i}}$$

$$(Eq.4) \quad \ln V_{1_i} = \theta_{V_1,1} + \theta_{V_1,2} \cdot cov_1 + \theta_{V_1,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{V_1,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{V_{1_i}}$$

$$(Eq.5) \quad \ln V_{2_i} = \theta_{V_2,1} + \theta_{V_2,2} \cdot cov_1 + \theta_{V_2,3} \cdot cov_2 + \dots + \theta_{V_2,n} \cdot cov_{n-1} + \eta_{V_{2_i}}$$

Where Cl_i , Cl_{d_i} , V_{1_i} and V_{2_i} are respectively the expected clearance, distribution clearance, volume of the first and second compartment of the i-th horse, cov are fixed effects variables, and θ are constant parameters or proportionality constants that quantify the influence of the variable on the pharmacokinetic parameters when related to a variable. Also, η_{Cl_i} , $\eta_{Cl_{d_i}}$, $\eta_{V_{1_i}}$ and $\eta_{V_{2_i}}$ are normally distributed random variables, with an expected value of zero and respective variances of ω^2_{Cl} , $\omega^2_{Cl_d}$, $\omega^2_{V_1}$ and $\omega^2_{V_2}$, which are estimated by the software, accounting for inter-individual errors. Preliminary analysis indicated that intra- and inter-individual errors were best described using a power model of variance. Thus, variance was described as a function of the squared fitted value of

plasma concentration. Since pharmacokinetic parameters were considered as independent, covariances between them were nil.

Regression models were built using a stepwise procedure, starting with a model without covariables. The likelihood ratio test was used to compare models. A P value of 0.05% was considered significant. Demographic, physiological and disease's covariables were used. Demographic variables were breed, weight, age and sex. Physiological variables were activity status (training, rest, or competition), and haematology (hematocrit, fibrinogen) and biochemistry parameters (glucose, urea, creatinine, bilirubin, AST, alkaline phosphatase, γ -glutamyl transferases, creatine kinase, total plasma protein, albumin, calcium, phosphorus, sodium, potassium and chloride). Variables related to the disease were: clinical status at injection time (healthy/diseased), rectal temperature, type and stage of the disease, medication prior to or concurrent with the administration of marbofloxacin.

The concentration-time profile was described by the following equation:

$$(Eq.6) \quad Cp_{ij} = E\{Cp_{ij}\} \cdot (1 + \varepsilon_{ij})$$

Where Cp_{ij} is the observed plasma concentration of the i -th horse at time j , $E(Cp_{ij})$ is the expected value of the plasma concentration of the i -th horse at time j , ε_{ij} is a normally distributed random variable with a mean of zero and a variance of σ^2 estimated by the software. ε_{ij} accounts for the residual variability of the data resulting from intra-individual variability, assay errors, model misspecification and any other sources of variability.

Exposure to marbofloxacin and pharmacodynamic surrogate markers

Exposure of horses to marbofloxacin was assessed using the area under the curve (AUC) of the plasmatic concentrations of marbofloxacin versus time, calculated with equation 7:

$$(Eq. 7) \quad AUC = \frac{Dose}{Cl}$$

To assess possible clinical consequences of the variation in the exposure to marbofloxacin, the ratio of area under the curve divided by the minimum inhibitory concentration (AUC/MIC) of hypothetical bacteria was simulated. The MIC_{90%} for *Enterobacteriaceae* (MIC₉₀= 0.027 µg/mL), retrieved from literature (Bousquet-Melou *et al.*, 2002), and the breakpoint concentration used to discriminate sensitive and intermediately sensitive isolates in antimicrobial susceptibility tests (MIC= 0.1 µg/mL) (NCCLS, 1999) were used. An AUC/CMI ratio below 60, or above 120, was considered to be respectively a forecast of a low, or high, probability of a positive clinical outcome.

RESULTS

Data from three horses were removed from the final data set because they interfered with the algorithm convergence. Results from the initial regression model with no covariable (model 1) are summarized in Table 1. Interindividual variability of clearance, distribution clearance, V_1 and V_2 , expressed as coefficient of variation (CV), was respectively 36%, 54%, 18% and 40%. Residual variability, expressed as a coefficient of proportionality with the squared predicted concentration, was 7%. Analysis with different covariables did not reveal evidence of a correlation between demographic, physiological or disease variables and Cl_d , V_1 or V_2 . Clearance was related to clinical status at injection time (CS), treatment in the week before administration of marbofloxacin with NSAIDs (W_{NSAIDS}) or antibiotics ($W_{antibio}$), and simultaneous treatment with NSAIDs (T_{NSAIDS}) or corticosteroids ($T_{cortico}$) and marbofloxacin. Five regression models with each qualitative variable are presented in Table 1. A significant difference ($P < 0.01$) was found between models with 2 to 6 and model 1 but no significant difference was demonstrated between each model 2 to 6. Regression models with two covariables were not significantly different than models with only one covariable. A high correlation was found between the 5 covariables above-mentioned.

Model 6 was chosen as the final model because of a very good fit between predicted and observed concentrations (Figure 1) and because the status of the horse at injection time was the most reliable variable to record. According to the final model, systemic clearance of marbofloxacin was higher for healthy animals than diseased animals, 0.284 L/h/kg and 0.209 L/h/kg respectively (Table 1). Distribution clearance, V_1 and V_2 were respectively 0.130 L/kg/h, 1.3 L/kg and 0.6 L/kg. Interindividual variability of clearance, distribution clearance, V_1 and V_2 , expressed as CV, was respectively 29%, 41%, 19% and 42%.

Residual variability, expressed as a coefficient of proportionality with the squared predicted concentration, was 6%. Analysis of residuals to test the hypothesis of equal variance of the pharmacokinetic parameters in the 2 sub-populations demonstrated a greater variance for diseased horses, with a standard deviation (SD) of 0.106 L/h/kg (coefficient of variation (CV) = 52%), compared to healthy horses with a SD of 0.042 L/h/kg (CV= 15%) (Figure 2).

Healthy horses had a smaller AUC with less variance than diseased horses, respectively with a mean of 7.149 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ with a SD of 0.984 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ (CV= 14%) and 9.653 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ with a SD of 3.967 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ (CV= 41%). As a result, surrogate markers AUC/MIC were poor for a higher percentage of diseased horses than healthy horses at the tested concentrations (Table 2). However 24 % of diseased horses could obtain a ratio above 125 for a MIC of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ while a very small percentage (<0.1%) of healthy horses would be able to obtain such a ratio.

DISCUSSION

Population pharmacokinetic (PopPK) analysis is widely used in human medicine but few articles have been published in veterinary medicine to date. The PopPK approach allows study of the effect of various patient characteristics in a target population on pharmacokinetic parameters. As a result, sub-populations can be identified with different trends in their pharmacokinetic (PK) parameters, and correlations can be found between a given subject characteristic and a PK parameter, allowing dose adjustment or prediction of tissue residues (Martin-Jimenez & Riviere, 1998). Fluoroquinolones are drugs with high therapeutic value in both human and veterinary practice. A better knowledge of their PK parameters may preserve their efficacy because more precise therapeutic recommendations can maximise their potency and minimize risks of antimicrobial drug resistance.

In human studies, fluoroquinolone PK parameters have been associated with race, age, gender, creatinine clearance, site of infection and weight (Preston *et al.*, 1998; Rodvold & Neuhauser, 2001). Demographic, physiologic and disease variables were recorded and tested in the present study. However, power of analysis was limited because data of only 16 diseased horses were available. Plasma concentrations of three horses were not used because of unexplained unusual profiles: an increase in marbofloxacin concentration was observed between two successive samples, and the regression algorithm was then unable to converge. This may be explained by errors in the study (sampling error, assay error, misidentification of samples...) or a true unusual concentration-time profile in diseased animals, which should be explored by further studies in diseased horses.

Only five qualitative covariables (CS, W_{NSAIDS} , W_{antibio} , T_{NSAIDS} , and T_{cortico}) were significant when added individually to the regression equation of plasma clearance.

Interindividual variability of plasma clearance decreased from the initial (CV=36%) to the final model (CV=29%), signifying that the covariable CS explained almost 20% of this variability. Adding a second covariable did not significantly improve the model because all these variables were highly correlated since every horse which had received NSAIDs, antimicrobial drugs or corticosteroids before or simultaneously with injection of marbofloxacin was also in the group of diseased horses (CS=1).

The regression model without covariables in this study provided a clearance value which is very close or slightly higher to previously published values for marbofloxacin in horses (Bousquet-Melou *et al.*, 2002; Carretero *et al.*, 2002). However, this study shows that with the final model, mean systemic clearance was greater ($P<0.01$) in healthy horses than in diseased horses. Modification of the plasma clearance of fluoroquinolones has been described in diseased animals in other species. Clearance of enrofloxacin was slower in pigs experimentally infected with *E.coli* (Zeng & Fung, 1997) or injected with endotoxin (Post *et al.*, 2003) compared to healthy pigs. However infection of pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* did not modify systemic clearance of enrofloxacin (Post *et al.*, 2002). Clearance of marbofloxacin has been found to decrease with endotoxin-induced fever in goats (Waxman *et al.*, 2003). In dogs, mild experimentally-induced renal impairment slightly decreased the clearance of marbofloxacin but no significant variation of volume of distribution at steady state or mean residence time was observed (Lefebvre *et al.*, 1998). Decreased systemic clearance of drugs has been associated with inhibition of hepatic metabolism during the acute phase of inflammation (Monshouwer & Witkamp, 2000) and impaired hepatic or renal function (Baggot, 1980; Hirata *et al.*, 1989). Gram-negative bacterial infections are likely to generate endotoxin, which has been shown to decrease the activity of hepatic metabolism and to have toxic effects on the kidneys such

as a decrease in renal blood flow and glomerular filtration rate, and changes in intrarenal hemodynamics (Hasegawa *et al.*, 1999).

Part of the regression model which assumes homoscedasticity was invalidated by the higher variability among diseased horses. The importance of this assumption should be assessed by using heteroscedastic models and with a validation group in future studies. Many pathological mechanisms can lead to a wide variability of PK parameters in diseased states, which is a major concern because when the inter-individual variability is great, mean values are not representative of a large fraction of the population and individualized therapeutic schemes may be required (Riviere, 1999).

The high variability in clearance leads to a high variability of the AUC and therefore of the exposure to marbofloxacin. A high variability of exposure can be associated with a higher risk of emergence of a resistant bacterial strain during treatment, a lower probability of positive outcomes in case of underexposure, and a higher risk of toxic effects in cases of overexposure (Hyatt *et al.*, 1995; Craig, 1998). Furthermore, in this experiment, marbofloxacin was injected intravenously while an even greater variability of AUC would be expected with an oral administration because of the variability of bioavailability in diseased states. The AUC/MIC ratio has been proposed as a surrogate marker of efficacy. In human medicine, a target value 100-125 has been proposed to guarantee a successful clinical outcome from fluoroquinolones (Forrest *et al.*, 1993; Hyatt *et al.*, 1995; Craig, 1998). However, some authors (Madaras-Kelly *et al.*, 1996) consider that a lower value (50-75) of this ratio is more likely to be adequate, especially in immunocompetent patients, even though a low ratio value is associated with a longer time to eradication of bacteria (Schentag *et al.*, 2003). In veterinary medicine, few studies are available and no correlations between efficacy indices and clinical outcomes have been

established in horses to date. However, using *ex-vivo* data, a pharmacokinetic/pharmacodynamic study of marbofloxacin in calves has demonstrated a bacteriostatic effect with a ratio as low as 37 and a bactericidal effect with a ratio of 46 while elimination of bacteria was achieved with a ratio of 120 (Aliabadi & Lees, 2002). Therefore, in the current study, a breakpoint value of 60 or lower was chosen to represent a situation where a high risk of unsuccessful clinical outcome can be expected while a breakpoint value of 125 was related with a high probability of successful outcome. When using the MIC₉₀ of *Enterobacteriaceae* (Bousquet-Melou *et al.*, 2002) and the MIC breakpoint value between sensitive and intermediately sensitive strains to calculate ratios, diseased animals had a higher risk of achieving a ratio under 60 and an unsuccessful clinical outcome than healthy horses. Using a bacterial strain with a MIC of 0.1 µg/mL, classified as “sensitive” in an antimicrobial susceptibility test, almost one horse out of five (19%) had a poor prediction ratio. However 24% of diseased horses had a ratio above 125 with this MIC and less than 0.1% of health horses obtained such a ratio. Ultimately, these data reveal that even if the AUC is higher in diseased horses, because of its high variability, prediction of the outcome of an individual can be difficult and failure of therapy can occur.

This study demonstrates that population pharmacokinetics on diseased horses is needed to design dosage regimens for marbofloxacin since pharmacokinetic parameters cannot be easily extrapolated from healthy animals. Both means and variances of PK parameters can vary and, consequently, so does the exposure to the drug. With the current final regression model, a marbofloxacin dosage regimen of 2 mg/kg bwt/24h seemed to be sufficient to achieve a high AUC/MIC ratio for *Enterobacteriaceae*, but efficacy was less than certain

on bacterial strains with higher MICs but still classified as sensitive. These results should be confirmed and validated with a larger group of diseased animals and with a regression model which can more accurately assess different interindividual variances. Finally, there is a need to produce data on the correlation between AUC/MIC and the clinical outcome *in vivo* for horses.

Figure 1: plot of observed versus predicted plasma concentrations of marbofloxacin using the final model including “clinical status” as covariable.

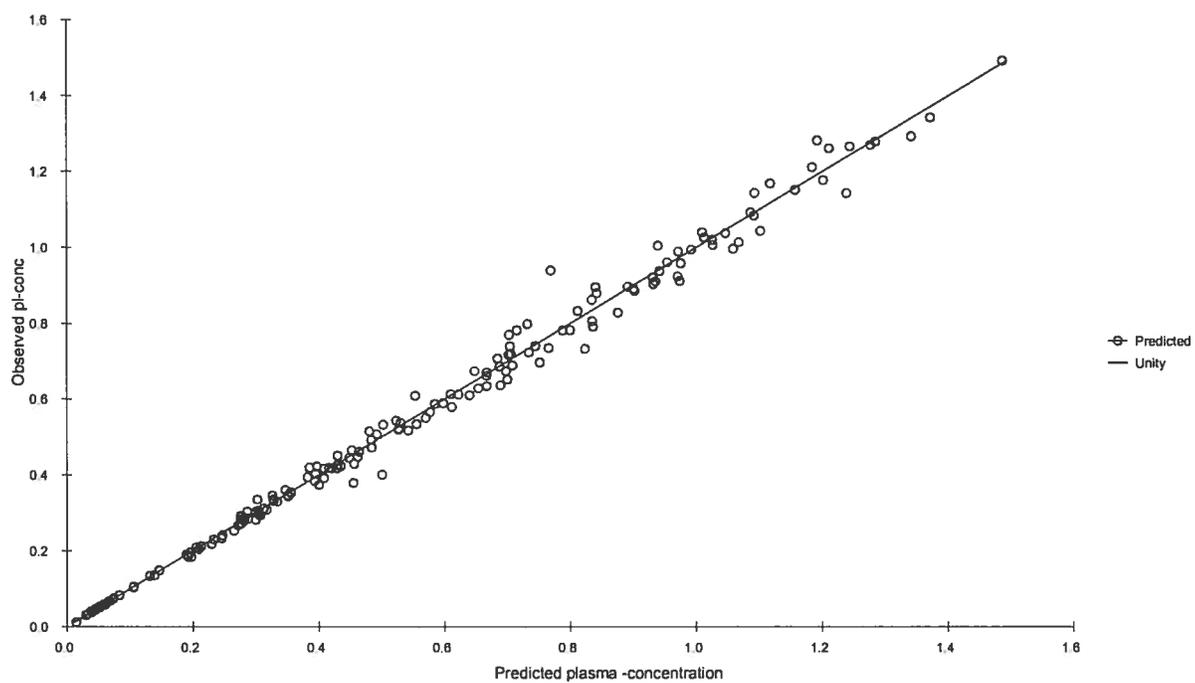


Figure 2: residual plot of clearance in healthy and diseased sub-populations using the final model (“clinical status” as covariable). Interindividual variability of clearance is greater in diseased horses (CV=52%) than healthy horses (CV=15%).

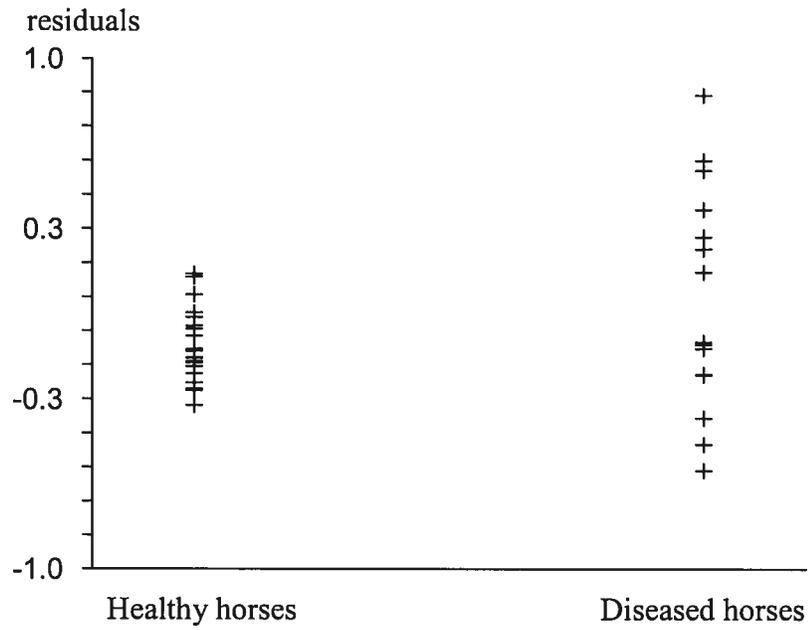


Table 1: Parameters used for six regression model. CS (“Clinical Status”) has a value of 0 in healthy horses and 1 in diseased horses. T_{cortico} and T_{NSAIDS} have a value of 1 if, respectively, corticosteroids or non-steroids anti-inflammatory drugs were simultaneously administered with marbofloxacin, and otherwise they have a value of 0. W_{antibio} , W_{NSAIDS} have a value of 1 if, respectively, antimicrobial drugs or non-steroids anti-inflammatory drugs were administered the week before marbofloxacin injection, and otherwise they have a value of 0.

Model	Regression model (fixed effects) V1, V2 : L/kg Cl, Cld : L/h/kg	Coefficient of variation (%)				Residual variability (%)	-2 log likelihood
		Cl	Cld	V1	V2		
1	Cl = 0.247 Cld = 0.135 V1 = 1.3 V2 = 0.6	6	4	8	0	7	-470
2*	Cl = 0.234 – 0.109 T_{cortico} Cld = 0.131 V1 = 1.3 V2 = 0.6	3	7	8	6	6	-485
3*	Cl = 0.270 – 0.100 T_{NSAIDS} Cld = 0.131 V1 = 1.3 V2 = 0.6	9	8	9	2	6	-501
4*	Cl = 0.279 – 0.082 W_{antibio} Cld = 0.134 V1 = 1.3 V2 = 0.6	8	9	0	6	6	-498
5*	Cl = 0.266 – 0.082 W_{NSAIDS} Cld = 0.125 V1 = 1.3 V2 = 0.6	0	0	9	1	6	-493
6*	Cl = 0.284 – 0.075 CS Cld = 0.13 V1 = 1.3 V2 = 0.6	9	1	9	2	6	-493

*: P-value < 0.01 when compared to model 1.

Table 2: Simulated percent of horses obtaining an AUC/MIC ratio below 60h or above 125h for two different MIC values.

MIC	% of diseased horses		% of healthy horses	
	AUC/MIC<60h	AUC/MIC>125h	AUC/MIC<60h	AUC/MIC>125h
0.027 µg/mL	3%	93%	<0.1%	>99.9%
0.1 µg/mL	19%	24%	13%	<0.1%

REFERENCES

- Aliabadi, F. S. and P. Lees (2002). "Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate." *J Vet Pharmacol Ther* **25**(3): 161-74.
- Baggot, J. D. (1980). "Distribution of antimicrobial agents in normal and diseased animals." *J.Am.Vet.Med.Assoc.* **176**(10 Spec No): 1085-1090.
- Bousquet-Melou, A., S. Bernard, M. Schneider and P. L. Toutain (2002). "Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses." *Equine Vet J* **34**(4): 366-72.
- Brown, S. A. (1996). "Fluoroquinolones in animal health." *J Vet Pharmacol Ther* **19**(1): 1-14.
- Carretero, M., C. Rodriguez, M. I. San Andres, P. Fores, J. J. de Lucas, J. Nieto, S. Waxman, M. D. San Andres and F. Gonzalez (2002). "Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration." *Equine Vet J* **34**(4): 360-5.
- Craig, W. A. (1998). "Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men." *Clin.Infect.Dis.* **26**(1): 1-10.
- Forrest, A., D. E. Nix, C. H. Ballow, T. F. Goss, M. C. Birmingham and J. J. Schentag (1993). "Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients." *Antimicrob Agents Chemother* **37**(5): 1073-81.
- Hasegawa, T., K. Takagi and K. Kitaichi (1999). "Effects of bacterial endotoxin on drug pharmacokinetics." *Nagoya J Med Sci* **62**(1-2): 11-28.
- Hirata, C. A., D. R. Guay, W. M. Awni, D. J. Stein and P. K. Peterson (1989). "Steady-state pharmacokinetics of intravenous and oral ciprofloxacin in elderly patients." *Antimicrob.Agents Chemother.* **33**(11): 1927-1931.
- Hyatt, J. M., P. S. McKinnon, G. S. Zimmer and J. J. Schentag (1995). "The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents." *Clin.Pharmacokinet.* **28**(2): 143-160.
- Lefebvre, H. P., M. Schneider, V. Dupouy, V. Laroute, G. Costes, L. Delesalle and P. L. Toutain (1998). "Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog." *J.Vet.Pharmacol.Ther.* **21**(6): 453-461.
- Madaras-Kelly, K. J., B. E. Ostergaard, L. B. Hovde and J. C. Rotschafer (1996). "Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an in vitro pharmacodynamic model." *Antimicrob.Agents Chemother.* **40**(3): 627-632.

Martin-Jimenez, T. and J. E. Riviere (1998). "Population pharmacokinetics in veterinary medicine: potential use for therapeutic drug monitoring and prediction of tissue residues." *J Vet Pharmacol Ther* **21**(3): 167-189.

Monshouwer, M. and R. F. Witkamp (2000). "Cytochromes and cytokines: changes in drug disposition in animals during an acute phase response: a mini-review." *Vet.Q.* **22**(1): 17-20.

NCCLS (1999). National Committee for Clinical Laboratory Standard, Tentative standard M31-A vol.19 N 11.

Post, L. O., C. V. Cope, D. E. Farrell, J. D. Baker and M. J. Myers (2002). "Influence of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection and dexamethasone on the pharmacokinetic parameters of enrofloxacin." *J Pharmacol Exp Ther* **301**(1): 217-22.

Post, L. O., D. E. Farrell, C. V. Cope, J. D. Baker and M. J. Myers (2003). "The effect of endotoxin and dexamethasone on enrofloxacin pharmacokinetic parameters in swine." *J Pharmacol Exp Ther* **304**(2): 889-95.

Preston, S. L., G. L. Drusano, A. L. Berman, C. L. Fowler, A. T. Chow, B. Dornseif, V. Reichl, J. Natarajan, F. A. Wong and M. Corrado (1998). "Levofloxacin population pharmacokinetics and creation of a demographic model for prediction of individual drug clearance in patients with serious community-acquired infection." *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(5): 1098-1104.

Riviere, J. E. (1999). Population pharmacokinetic models and bayesian forecasting applied to clinical pharmacokinetics. In *Comparative pharmacokinetics: principles, techniques, and applications*. 1st ed. Iowa State Press. pp. 259-282. Ames, Iowa, U.S.A.

Rodvold, K. A. and M. Neuhauser (2001). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones." *Pharmacotherapy* **21**(10 Pt 2): 233S-252S.

Schentag, J. J., A. K. Meagher and A. Forrest (2003). "Fluoroquinolone AUC break points and the link to bacterial killing rates. Part 2: human trials." *Ann Pharmacother* **37**(10): 1478-88.

Schneider, M., V. Thomas, B. Boisrame and J. Deleforge (1996). "Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration." *J Vet Pharmacol Ther* **19**(1): 56-61.

Spreng, M., J. Deleforge, V. Thomas, B. Boisrame and H. Drugeon (1995). "Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates." *J Vet Pharmacol Ther* **18**(4): 284-9.

Waxman, S., M. D. San Andres, F. Gonzalez, J. J. De Lucas, M. I. San Andres and C. Rodriguez (2003). "Influence of *Escherichia coli* endotoxin-induced fever on the

pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous administration in goats." *J Vet Pharmacol Ther* **26**(1): 65-9.

WinNonMix (2000). WinNonMix Professional, v 2.0.1, Pharsight corporation.

Zeng, Z. L. and K. F. Fung (1997). "Effects of experimentally induces *Escherichia coli* infection on the pharmacokinetics of enrofloxacin in pigs." *J.Vet.Pharmacol.Ther.* **20**(suppl.1): 39-40.

DISCUSSION

Les méthodes de pharmacocinétique de population (PKpop) sont largement utilisées en médecine humaine mais peu d'études sont publiées en médecine vétérinaire à ce jour. L'approche par PKpop permet d'étudier les effets de différentes caractéristiques des individus d'une population cible sur les paramètres pharmacocinétiques (PK) d'un médicament, permettant ainsi d'identifier des tendances dans des sous-populations, d'établir des corrélations entre certaines caractéristiques d'un individu et un paramètre PK, pour ajuster des posologies ou prédire des résidus dans certains tissus [123]. Les fluoroquinolones sont des molécules à forte valeur thérapeutique en médecine humaine et vétérinaire. Une bonne connaissance de leur paramètres PK est à même de préserver leur efficacité car de meilleures recommandations pour ajuster la posologie permettent de maximiser leur efficacité thérapeutique et de minimiser les risques de sélection de souches bactériennes résistantes.

Dans des études sur l'Homme, les paramètres de la pharmacocinétique des fluoroquinolones ont été corrélés avec le type racial, l'âge, le sexe, la clairance de la créatinine, le site d'infection et le poids [1, 145]. Dans notre étude, des variables démographiques, physiologiques et reliées à la maladie ont été testées, cependant la puissance de l'analyse était limitée par le faible nombre de chevaux malades disponibles. Les données des concentrations plasmatiques de trois chevaux ont été retirées de l'analyse à cause d'un profil des concentrations en fonction du temps inhabituel : des concentrations croissantes d'antibiotiques ont été observées entre deux prélèvements successifs. L'algorithme était alors dans l'impossibilité de converger et de donner des résultats précis et stables. Ces profils inhabituels peuvent être expliqués par des erreurs dans le déroulement de l'expérimentation (erreur lors du prélèvement, mauvaise identification des tubes, erreurs lors du dosage de la marbofloxacine...) ou par une pharmacocinétique inhabituelle chez les animaux malades, qui devrait être explorée dans des études ultérieures.

Cinq covariables qualitatives ont été significatives de manière individuelle dans le modèle de régression de la clairance systémique :

1. CS : statut clinique du cheval lors de l'injection de marbofloxacin ;
2. W_{NSAIDS} : anamnèse de l'administration d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens dans la semaine précédant l'étude ;
3. $W_{antibio}$: anamnèse de l'administration d'antibiotiques dans la semaine précédant l'étude ;
4. T_{NSAIDS} : administration d'un anti-inflammatoire non-stéroïdien concomitant avec la marbofloxacin ;
5. $T_{cortico}$: administration d'un corticoïde concomitant avec la marbofloxacin.

La variabilité de la clairance plasmatique, exprimée sous forme de coefficient de variation (CV), a diminué de 36% à 29% du modèle initial (sans covariable) au modèle finale (avec la covariable CS), ce qui indiquait que la covariable CS expliquait environ 20% de cette variabilité. L'ajout d'une seconde covariable dans la régression ne permettait pas d'améliorer le modèle global et n'était pas significative car une forte corrélation existait entre les cinq covariables ci-dessus. En effet tous les chevaux ayant reçu des anti-inflammatoires non-stéroïdiens, des corticoïdes ou des antibiotiques avant ou en même temps que l'étude, étaient classés dans la catégorie des chevaux malades (CS=1).

Avec un modèle de régression sans covariable, la valeur estimée de la clairance systémique est très proche ou légèrement supérieure à celles obtenus dans des études antérieures chez des chevaux sains [6, 7]. Cependant, avec le modèle final, la clairance systémique est plus grande en moyenne chez les chevaux sains que chez les malades ($p < 0.1$). Les modifications de la clairance des fluoroquinolones chez les animaux ont déjà été décrites dans d'autres espèces animales. La clairance de l'enrofloxacin est diminuée chez des porcs infectés expérimentalement par des bactéries *E.coli* [136] ou injectés avec des endotoxines [146]. Par contre, la clairance n'est pas modifiée avec une infection par *Actinobacillus pleuropneumoniae* [138]. Une diminution de la clairance de la marbofloxacin a été observée chez des caprins avec de la fièvre induite par des endotoxines bactériennes [139]. Chez le chien, une insuffisance rénale induite

expérimentalement diminue légèrement la clairance de la marbofloxaciné mais aucune variation significative n'a été observée dans le volume de distribution à l'équilibre ou dans le temps de résidence moyen [110]. Une diminution de la clairance systémique de certains médicaments a été associée à une inhibition du métabolisme hépatique pendant la phase aiguë de l'inflammation [147] et à des fonctions rénales et hépatiques amoindries [131, 148]. Les infections par des bactéries Gram-négatives sont susceptibles de générer des endotoxines qui ont été associées à une diminution du métabolisme hépatique et peuvent induire des effets toxiques sur le rein, tels qu'une diminution du flux sanguin et du taux de filtration glomérulaire, et des changements de l'hémodynamique intra-rénale [149].

L'homoscédasticité de la clairance, hypothèse de notre modèle de régression, a été invalidée par l'étude des résidus de la variance dans les deux sous-populations (sains/malades). L'importance du non-respect de cette hypothèse devra être étudiée par des modèles hétéroscédastiques et des échantillons d'animaux plus importants, permettant notamment la formation de groupe de validation. Plusieurs mécanismes physiopathologiques peuvent aboutir à une plus grande variance de la clairance chez les animaux malades, en ayant pour conséquence une moindre représentativité des valeurs moyennes de la population. En effet, dans ce cas, les valeurs moyennes ne représentent plus une large partie de la population et une adaptation individualisée des posologies peut alors s'avérer nécessaire [140].

La forte variabilité de la clairance systémique a eu pour résultat une forte variabilité de l'exposition des chevaux à la marbofloxaciné, mesurée par l'ASC, avec des coefficients de variation de 41% chez les malades contre 14% chez les sains. Une forte variabilité peut avoir comme conséquences de plus forts risques d'émergence de souches bactériennes résistantes et moins grandes chances de succès thérapeutique en cas de sous-exposition, tandis qu'en cas de surexpositions des effets toxiques peuvent survenir [5, 61]. En outre, dans cette étude, la marbofloxaciné a été injectée par voie intraveineuse, et on peut s'attendre à une variabilité encore plus forte lors de l'administration par d'autres voies, à cause de la variabilité de la phase d'absorption. Le ratio ASC/CMI a été proposé comme indicateur de l'efficacité des fluoroquinolones. Chez l'Homme, une valeur cible de 100-125 a été proposé pour garantir le succès thérapeutique [5, 61, 66]. Cependant,

certain auteurs ont considéré que des valeurs plus basses, de l'ordre de 50-75 [65], pouvaient être suffisantes, notamment pour des patients immunocompétents, même si un ratio plus faible est associé avec un temps d'éradication de la bactérie plus long [150]. En médecine vétérinaire, peu d'études sont disponibles et aucune corrélation n'a été faite entre des valeurs d'indices prédictifs et le succès de l'antibiothérapie. On peut cependant citer une étude de pharmacocinétique et pharmacodynamique de la marbofloxacin chez les veaux. Les données, *ex vivo*, ont démontré qu'un ratio ASC/CMI de 37 permettait d'obtenir un effet bactériostatique et un ratio de 46 permettait un effet bactéricide. Un ratio de 120 était nécessaire pour une élimination totale de la bactérie [112]. Ainsi des valeurs seuils de 60 et 125 ont été choisies pour être des prédictions respectivement de faibles chances de succès thérapeutiques si le ratio est en dessous et de fortes chances de succès thérapeutique si le ratio est plus grand.

En utilisant la CMI_{90%} des *Enterobacteriaceae* (0.027 µg/mL) [6] ou la CMI qui distingue les bactéries sensibles des bactéries de sensibilité intermédiaire sur un antibiogramme (0.1 µg/mL) [144], pour calculer des ratios ASC/CMI, il est apparu que les chevaux malades auraient eu une plus forte probabilité d'avoir un ratio inférieur à 60 que les chevaux sains. Pour des bactéries avec la CMI la plus élevée dans la catégorie des bactéries classées sensibles (0.1 µg/mL), environ un cheval sur cinq (19%) avait un ratio défavorable. Par contre, 24% des chevaux malades auraient pu avoir un ratio supérieur à 125 alors qu'ils n'auraient été que très peu (<0.1%) dans sous-groupe des chevaux sains. Avec la CMI_{90%} des *Enterobacteriaceae*, 93% des chevaux malades auraient pu atteindre un ratio supérieur à 125. Ces données ont mis en évidence qu'une variation interindividuelle importante de l'exposition avait pour conséquence des difficultés dans la prédiction de l'issue d'une posologie chez un individu particulier et que des échecs thérapeutiques sont à attendre avec une posologie de 2 mg/kg pour des bactéries classées sensibles mais à CMI élevées.

CONCLUSION

Les paramètres de la pharmacocinétique d'un médicament sont rarement extrapolables des individus sains aux individus malades. Pourtant la plupart des études pharmacocinétiques vétérinaires sont réalisées chez des animaux sains, sans que des études ultérieures les vérifient chez des animaux malades. Cette étude démontre l'intérêt des méthodes de pharmacocinétique de population, appliquées à une fluoroquinolone chez le cheval, dans l'étude de la variabilité engendrée par les processus physiopathologiques.

Avec le modèle de régression finale de la marbofloxacin chez le cheval, une dose de 2mg/kg par voie intraveineuse de marbofloxacin semble suffisante pour obtenir un ratio ASC/CMI élevé, indiquant de fortes chances de succès thérapeutique, vis-à-vis de la grande majorité des *Enterobacteriaceae*. Par contre, l'efficacité de ce régime posologique est moins garantie des bactéries avec une CMI plus élevée mais restant considérées sensibles par un antibiogramme. Il convient de confirmer ces résultats sur un plus grand nombre d'animaux et la construction d'un modèle hétéroscédastique devrait être entreprise.

Enfin, l'établissement de valeurs seuils pour les indices prédictifs, dans le cadre de l'antibiothérapie chez les animaux, est un domaine qu'il convient d'étudier afin d'assurer le succès des thérapies vétérinaires mais également pour mieux protéger la santé humaine en limitant les risques d'émergence de souches bactériennes résistantes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Preston, S.L., et al., *Levofloxacin population pharmacokinetics and creation of a demographic model for prediction of individual drug clearance in patients with serious community-acquired infection*. Antimicrob. Agents Chemother., 1998. **42**(5): p. 1098-1104.
2. Schneider, M., et al., *Pharmacokinetics of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration*. J Vet Pharmacol Ther, 1996. **19**(1): p. 56-61.
3. Spreng, M., et al., *Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates*. J Vet Pharmacol Ther, 1995. **18**(4): p. 284-9.
4. Brown, S.A., *Fluoroquinolones in animal health*. J Vet Pharmacol Ther, 1996. **19**(1): p. 1-14.
5. Hyatt, J.M., et al., *The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents*. Clin. Pharmacokinet., 1995. **28**(2): p. 143-160.
6. Bousquet-Melou, A., et al., *Pharmacokinetics of marbofloxacin in horses*. Equine Vet J, 2002. **34**(4): p. 366-72.
7. Carretero, M., et al., *Pharmacokinetics of marbofloxacin in mature horses after single intravenous and intramuscular administration*. Equine Vet J, 2002. **34**(4): p. 360-5.
8. Kammer, R.B., *Milestones in antimicrobial therapy.*, in *Chemistry and Biology of Beta-lactam antibiotics.*, R.B. Morin and M. Gorman, Editors. 1982, Academic Press: Orlando, FL.
9. Emmerson, A.M. and A.M. Jones, *The quinolones: decades of development and use*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51 Suppl 1**: p. 13-20.
10. Grohe, K., *The chemistry of the quinolones : methods of synthesizing the quinolone ring system*, in *Quinolone antibacterials*, J. Kuhlman, Editor. 1998, Springer-Verlag: New-York.
11. Segev, S. and E. Rubinstein, *Future aspects*, in *Quinolones Antibacterials*, J. Kuhlman, Editor. 1998, Springer-Verlag: New-York. p. p455.
12. Lescher, G.Y., et al., *1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapy agents*. Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 1962. **5**: p. 1063-8.
13. Petersen, U. and T. Schenke, *The chemistry of the quinolones : chemistry of the periphery of the quinolones*, in *Quinolone antibacterials*, J. Kuhlman, Editor. 1998, Springer-Verlag: New-York. p. 63.
14. Tillotson, G.S., *Quinolones: structure-activity relationships and future predictions*. J Med Microbiol, 1996. **44**(5): p. 320-4.
15. Ito, A., et al., *In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog*. Antimicrob Agents Chemother, 1980. **17**(2): p. 103-8.
16. Goueffon, Y., et al., *[A new synthetic antibacterial : 1-ethyl-6-fluoro-7-(4-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-1, 4-dihydroquinolin-3-carboxylic acid (1589 R.B.)]*. C R Seances Acad Sci III, 1981. **292**(1): p. 37-40.

17. Sato, K., et al., *In vitro and in vivo activity of DL-8280, a new oxazine derivative*. Antimicrob Agents Chemother, 1982. **22**(4): p. 548-53.
18. Wise, R., J.M. Andrews, and L.J. Edwards, *In vitro activity of Bay 09867, a new quinoline derivative, compared with those of other antimicrobial agents*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. **23**(4): p. 559-64.
19. Nakamura, S., et al., *In vitro and in vivo antibacterial activities of AT-4140, a new broad-spectrum quinolone*. Antimicrob Agents Chemother, 1989. **33**(8): p. 1167-73.
20. Imada, T., et al., *In vitro and in vivo antibacterial activities of a new quinolone, OPC-17116*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(3): p. 573-9.
21. Hosaka, M., et al., *In vitro and in vivo antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(10): p. 2108-17.
22. Wise, R., J.P. Ashby, and J.M. Andrews, *In vitro activity of PD 127,391, an enhanced-spectrum quinolone*. Antimicrob Agents Chemother, 1988. **32**(8): p. 1251-6.
23. Eliopoulos, G.M., et al., *In vitro activity of CP-99,219, a new fluoroquinolone, against clinical isolates of gram-positive bacteria*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(2): p. 366-70.
24. Dalhoff, A., U. Petersen, and R. Endermann, *In vitro activity of BAY 12-8039, a new 8-methoxyquinolone*. Chemotherapy, 1996. **42**(6): p. 410-25.
25. Wise, R. and J.M. Andrews, *The in-vitro activity and tentative breakpoint of gemifloxacin, a new fluoroquinolone*. J Antimicrob Chemother, 1999. **44**(5): p. 679-88.
26. Walker, R.D., *Fluoroquinolones*, in *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, J.F. Prescott, J.D. Baggot, and R.D. Walker, Editors. 2000, Iowa State University Press: Ames. p. 315-338.
27. Domagala, J.M., *Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials*. J Antimicrob Chemother, 1994. **33**(4): p. 685-706.
28. Gellert, M., et al., *Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(11): p. 4772-6.
29. Sugino, A., et al., *Mechanism of action of nalidixic acid: purification of Escherichia coli nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(11): p. 4767-71.
30. Khodursky, A.B., E.L. Zechiedrich, and N.R. Cozzarelli, *Topoisomerase IV is a target of quinolones in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11801-5.
31. Drlica, K. and X. Zhao, *DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(3): p. 377-92.
32. Smith, H.J., et al., *Dual activity of fluoroquinolones against Streptococcus pneumoniae: the facts behind the claims*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(6): p. 893-5.
33. Takei, M., et al., *Target preference of 15 quinolones against Staphylococcus aureus, based on antibacterial activities and target inhibition*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(12): p. 3544-7.
34. Eliopoulos, G.M., *In vitro activity of fluoroquinolones against gram-positive bacteria*. Drugs, 1995. **49 Suppl 2**: p. 48-57.

35. Appelbaum, P.C., *Quinolone activity against anaerobes*. Drugs, 1999. **58 Suppl 2**: p. 60-4.
36. Peterson, L.R., *Quinolone resistance in clinical practice*, in *Quinolone antimicrobial agents*, D.C. Hooper and J.S. Wolfson, Editors. 1993, American Society for Microbiology: Washington, D.C.
37. Brothers, A.M., P.S. Gibbs, and R.E. Wooley, *Development of resistant bacteria isolated from dogs with otitis externa or urinary tract infections after exposure to enrofloxacin in vitro*. Vet Ther, 2002. **3(4)**: p. 493-500.
38. Cohn, L.A., et al., *Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts*. J Vet Diagn Invest, 2003. **15(4)**: p. 338-43.
39. Bearden, D.T. and L.H. Danziger, *Mechanism of action of and resistance to quinolones*. Pharmacotherapy, 2001. **21(10 Pt 2)**: p. 224S-232S.
40. Hirai, K., et al., *Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of Salmonella typhimurium and Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1986. **29(3)**: p. 535-8.
41. Yoshimura, F. and H. Nikaido, *Permeability of Pseudomonas aeruginosa outer membrane to hydrophilic solutes*. J Bacteriol, 1982. **152(2)**: p. 636-42.
42. Putman, M., H.W. van Veen, and W.N. Konings, *Molecular properties of bacterial multidrug transporters*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64(4)**: p. 672-93.
43. Yoshida, H., et al., *Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34(6)**: p. 1271-2.
44. Munshi, M.H., et al., *Plasmid-mediated resistance to nalidixic acid in Shigella dysenteriae type 1*. Lancet, 1987. **2(8556)**: p. 419-21.
45. Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G.A. Jacoby, *Quinolone resistance from a transferable plasmid*. Lancet, 1998. **351(9105)**: p. 797-9.
46. Jacoby, G.A., N. Chow, and K.B. Waites, *Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47(2)**: p. 559-62.
47. Vila, J., et al., *Association between double mutation in gyrA gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Escherichia coli and MICs*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38(10)**: p. 2477-9.
48. Blaser, J., et al., *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, 1987. **31(7)**: p. 1054-60.
49. Turnidge, J., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones*. Drugs, 1999. **58 Suppl 2**: p. 29-36.
50. Frazier, D.L., et al., *Comparison of fluoroquinolone pharmacokinetic parameters after treatment with marbofloxacin, enrofloxacin, and difloxacin in dogs*. J Vet Pharmacol Ther, 2000. **23(5)**: p. 293-302.
51. Haines, G.R., et al., *Serum concentrations and pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intragastric administration to mares*. Can J Vet Res, 2000. **64(3)**: p. 171-7.
52. Chien, S.C., et al., *Pharmacokinetic profile of levofloxacin following once-daily 500-milligram oral or intravenous doses*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41(10)**: p. 2256-60.

53. Lubasch, A., et al., *Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. **44**(10): p. 2600-3.
54. FDA, *NADA 141-151 Freedom of information summary*. 1999, <http://www.fda.gov/cvm/efoi/section2/141-151062699.pdf>.
55. FDA, *NADA 141-096 Freedom of information summary*. 1997, <http://www.fda.gov/cvm/efoi/section2/141096112097.html>.
56. Schentag, J.J. and D.E. Nix, *Pharmacokinetics and tissue penetration of fluoroquinolones.*, in *Fluoroquinolones in the treatment of infectious diseases*, W.E. Sanders and C.C. Sanders, Editors. 1990, Physicians and Scientists Publishing Co.: Glenview, IL. p. 29-44.
57. Nakashima, M., et al., *Single- and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone, in humans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. **39**(12): p. 2635-40.
58. Craig, W.A. and S.C. Ebert, *Killing and regrowth of bacteria in vitro: a review*. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1990. **74**: p. 63-70.
59. AliAbadi, F.S. and P. Lees, *Antibiotic treatment for animals: effect on bacterial population and dosage regimen optimisation*. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 2000. **14**(4): p. 307-313.
60. Lees, P. and F.S. AliAbadi, *Rationalising dosage regimens of antimicrobial drugs: a pharmacological perspective*. *J.Med.Microbiol.*, 2000. **49**(11): p. 943-945.
61. Craig, W.A., *Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men*. *Clin.Infect.Dis.*, 1998. **26**(1): p. 1-10.
62. Toutain, P.L., J.R. del Castillo, and A. Bousquet-Melou, *The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics*. *Res.Vet.Sci.*, 2002. **73**(2): p. 105-114.
63. Lees, P. and A.F. Shojaee, *Rational dosing of antimicrobial drugs: animals versus humans*. *Int.J.Antimicrob.Agents*, 2002. **19**(4): p. 269-284.
64. Thomas, J.K., et al., *Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 1998. **42**(3): p. 521-527.
65. Madaras-Kelly, K.J., et al., *Twenty-four-hour area under the concentration-time curve/MIC ratio as a generic predictor of fluoroquinolone antimicrobial effect by using three strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an in vitro pharmacodynamic model*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 1996. **40**(3): p. 627-632.
66. Forrest, A., et al., *Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. **37**(5): p. 1073-81.
67. Ernst, E.J., et al., *Evaluation of survival and pharmacodynamic relationships for five fluoroquinolones in a neutropenic murine model of pneumococcal lung infection*. *Pharmacotherapy*, 2002. **22**(4): p. 463-470.
68. Preston, S.L., et al., *Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials*. *JAMA*, 1998. **279**(2): p. 125-129.
69. Polk, R.E., et al., *Effect of ferrous sulfate and multivitamins with zinc on absorption of ciprofloxacin in normal volunteers*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1989. **33**(11): p. 1841-4.

70. Van Slooten, A.D., et al., *Combined use of ciprofloxacin and sucralfate*. *Dicp*, 1991. **25**(6): p. 578-82.
71. Lober, S., et al., *Pharmacokinetics of gatifloxacin and interaction with an antacid containing aluminum and magnesium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999. **43**(5): p. 1067-71.
72. Radandt, J.M., C.R. Marchbanks, and M.N. Dudley, *Interactions of fluoroquinolones with other drugs: mechanisms, variability, clinical significance, and management*. *Clin Infect Dis*, 1992. **14**(1): p. 272-84.
73. Gries, J.M., et al., *Cimetidine does not alter sparfloxacin pharmacokinetics*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1995. **33**(11): p. 585-7.
74. Beckmann, J., et al., *Enoxacin--a potent inhibitor of theophylline metabolism*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1987. **33**(3): p. 227-30.
75. Stille, W., et al., *Decrease of caffeine elimination in man during co-administration of 4-quinolones*. *J Antimicrob Chemother*, 1987. **20**(5): p. 729-34.
76. Hirt, R.A., et al., *The effect of orally administered marbofloxacin on the pharmacokinetics of theophylline*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2003. **50**(5): p. 246-50.
77. Christ, W., *Central nervous system toxicity of quinolones: human and animal findings*. *J Antimicrob Chemother*, 1990. **26 Suppl B**: p. 219-25.
78. Kamali, F., et al., *Assessment of the effects of combination therapy with ciprofloxacin and fenbufen on the central nervous systems of healthy volunteers by quantitative electroencephalography*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(5): p. 1256-8.
79. Ball, P., *Adverse drug reactions: implications for the development of fluoroquinolones*. *J Antimicrob Chemother*, 2003. **51 Suppl 1**: p. 21-7.
80. Wolfson, J.S. and D.C. Hooper, *Overview of fluoroquinolone safety*. *Am J Med*, 1991. **91**(6A): p. 153S-161S.
81. Norrby, S.R., *Side-effects of quinolones: comparisons between quinolones and other antibiotics*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1991. **10**(4): p. 378-83.
82. Fish, D.N., *Fluoroquinolone adverse effects and drug interactions*. *Pharmacotherapy*, 2001. **21**(10 Pt 2): p. 253S-272S.
83. Hayem, G. and C. Carbon, *A reappraisal of quinolone tolerability. The experience of their musculoskeletal adverse effects*. *Drug Saf*, 1995. **13**(6): p. 338-42.
84. van der Linden, P.D., et al., *Tendon disorders attributed to fluoroquinolones: a study on 42 spontaneous reports in the period 1988 to 1998*. *Arthritis Rheum*, 2001. **45**(3): p. 235-9.
85. van der Linden, P.D., et al., *Fluoroquinolones and risk of Achilles tendon disorders: case-control study*. *Bmj*, 2002. **324**(7349): p. 1306-7.
86. Kato, M. and T. Onodera, *Morphological investigation of cavity formation in articular cartilage induced by ofloxacin in rats*. *Fundam Appl Toxicol*, 1988. **11**(1): p. 110-9.
87. Burkhardt, J.E., et al., *Histologic and histochemical changes in articular cartilages of immature beagle dogs dosed with difloxacin, a fluoroquinolone*. *Vet Pathol*, 1990. **27**(3): p. 162-70.
88. Tatsumi, H., et al., *Toxicological studies on pipemidic acid. V. Effect on diarthrodial joints of experimental animals*. *J Toxicol Sci*, 1978. **3**(4): p. 357-67.

89. Wiebe, V. and P. Hamilton, *Fluoroquinolone-induced retinal degeneration in cats*. J Am Vet Med Assoc, 2002. **221**(11): p. 1568-71.
90. Prescott, J.F. and K.M. Yielding, *In vitro susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin*. Can J Vet Res, 1990. **54**(1): p. 195-7.
91. Ganiere, J.P., et al., *Antimicrobial activity of enrofloxacin against Staphylococcus intermedius strains isolated from canine pyodermas*. Vet Dermatol, 2001. **12**(3): p. 171-5.
92. Lautzenhiser, S.J., et al., *In vitro antibacterial activity of enrofloxacin and ciprofloxacin in combination against Escherichia coli and staphylococcal clinical isolates from dogs*. Res Vet Sci, 2001. **70**(3): p. 239-41.
93. Paradis, M., et al., *Evaluation of the clinical efficacy of marbofloxacin (Zeniquin) tablets for the treatment of canine pyoderma: an open clinical trial*. Vet Dermatol, 2001. **12**(3): p. 163-9.
94. Abrams-Ogg, A., et al., *Blindness now attributed to enrofloxacin therapy in a previously reported case of a cat with acromegaly treated by cryohypophysectomy*. Can Vet J, 2002. **43**(1): p. 53-4.
95. Peyrou, M., R. Higgins, and J.P. Lavoie, *Évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques envers certains agents antibactériens dans un centre hospitalier vétérinaire*. Can Vet J, 2003(44): p. 978-981.
96. Bostian, A., et al. *Quinolone-induced arthropathy in neonatal foals*. in *Proceedings of 16th American College of Veterinary Internal Medicine forum*. 1998: p. 723. San Diego, California, USA.
97. Berg, J.N., *Clinical indications for enrofloxacin in domestic animals and poultry*. Proceedings of the Western veterinary conference, 1988: p. 25-33.
98. Specht, T.E. and G. Frederick, *Quinolone-induced arthropathy in immature Equidae*. J Am Vet Med Assoc, 1991. **198**(4): p. 516.
99. Bertone, A.L., et al., *Effect of long-term administration of an injectable enrofloxacin solution on physical and musculoskeletal variables in adult horses*. J Am Vet Med Assoc, 2000. **217**(10): p. 1514-21.
100. Beluche, L.A., et al., *In vitro dose-dependent effects of enrofloxacin on equine articular cartilage*. Am J Vet Res, 1999. **60**(5): p. 577-82.
101. Davenport, C.L., R.C. Boston, and D.W. Richardson, *Effects of enrofloxacin and magnesium deficiency on matrix metabolism in equine articular cartilage*. Am J Vet Res, 2001. **62**(2): p. 160-6.
102. Egerbacher, M., J. Edinger, and W. Tschulenck, *Effects of enrofloxacin and ciprofloxacin hydrochloride on canine and equine chondrocytes in culture*. Am J Vet Res, 2001. **62**(5): p. 704-8.
103. Singer, R.S., et al., *Antibiotic resistance--the interplay between antibiotic use in animals and human beings*. Lancet Infect Dis, 2003. **3**(1): p. 47-51.
104. van den Bogaard, A.E. and E.E. Stobberingh, *Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health*. Drugs, 1999. **58**(4): p. 589-607.
105. Teale, C.J., *Antimicrobial resistance and the food chain*. J Appl Microbiol, 2002. **92** Suppl: p. 85S-9S.
106. Khachatourians, G.G., *Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria*. CMAJ, 1998. **159**(9): p. 1129-36.

107. *Compendium of veterinary products*. 8th ed. 2003, Bayley, A.J.: Hensall, Ontario, Canada.
108. Dubreuil, L., I. Houcke, and I. Leroy, [*In vitro activity of a new fluoroquinolone, marbofloxacin (RO 09-1168) against strictly anaerobic bacteria and some bacteria from human fecal flora*]. *Pathol Biol (Paris)*, 1996. **44**(5): p. 333-6.
109. Seol, B., et al., *In vitro antimicrobial susceptibility of 183 Pseudomonas aeruginosa strains isolated from dogs to selected antipseudomonal agents*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2002. **49**(4): p. 188-92.
110. Lefebvre, H.P., et al., *Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog*. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, 1998. **21**(6): p. 453-461.
111. Cester, C.C., M. Schneider, and P.L. Toutain, *Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog : enrofloxacin versus marbofloxacin*. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 1996(10): p. 703-716.
112. Aliabadi, F.S. and P. Lees, *Pharmacokinetics and pharmacokinetic/pharmacodynamic integration of marbofloxacin in calf serum, exudate and transudate*. *J Vet Pharmacol Ther*, 2002. **25**(3): p. 161-74.
113. EMEA, *MARBOFLOXACIN - Summary repport (2)*. 1999, <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/069399en.pdf>.
114. Petracca, K. *Pharmacokinetics of marbofloxacin in pre-ruminant and ruminant cattle*. in *Proceedings of the 6th international congress of european association for veterinary pharmacology and toxicology*. 1993. Edinburgh.
115. Carlotti, D.N., et al., *Therapy of difficult cases of canine pyoderma with marbofloxacin: a report of 39 dogs*. *J Small Anim Pract*, 1999. **40**(6): p. 265-70.
116. Martin Barrasa, J.L., et al., *Antibacterial susceptibility patterns of Pseudomonas strains isolated from chronic canine otitis externa*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2000. **47**(3): p. 191-6.
117. Heinen, E., *Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin, and orbifloxacin in dogs after single oral administration*. *J Vet Pharmacol Ther*, 2002. **25**(1): p. 1-5.
118. Dossin, O., P. Gruet, and E. Thomas, *Comparative field evaluation of marbofloxacin tablets in the treatment of feline upper respiratory infections*. *J Small Anim Pract*, 1998. **39**(6): p. 286-9.
119. Kaartinen, L., S. Panu, and S. Pyorala, *Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration*. *Equine Vet J*, 1997. **29**(5): p. 378-81.
120. Haines, G.R., et al., *Pharmacokinetics of orbifloxacin and its concentration in body fluids and in endometrial tissues of mares*. *Can J Vet Res*, 2001. **65**(3): p. 181-7.
121. Rebuelto, M., et al., *Pharmacokinetics of fleroxacin in horses*. *J Vet Pharmacol Ther*, 2000. **23**(2): p. 103-5.
122. Rosenbaum, S.E., A.A. Carter, and M.N. Dudley, *population pharmacokinetics : fundamentals, methods and applications*. *Drug Dev Ind Pharm*, 1995. **21**(9): p. 1115-1141.
123. Martin-Jimenez, T. and J.E. Riviere, *Population pharmacokinetics in veterinary medicine: potential use for therapeutic drug monitoring and prediction of tissue residues*. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, 1998. **21**(3): p. 167-189.

124. Monfared, A.A.T., *Population pharmacokinetics analysis of cyclosporine A using STS and NonMem*, in *Faculté de pharmacie*. 2001, Université de Montréal: Montréal.
125. Steimer, J.L., et al., *The Population Approach: Rationale, Methods, and Applications in Clinical Pharmacology and Drug Development*, in *Pharmacokinetics of drugs*, P.G. Welling and L.P. Balant, Editors. 1994, Springer-Verlag: Berlin, N.Y.
126. Martin-Jimenez, T. and J.E. Riviere, *Mixed-effects modeling of the interspecies pharmacokinetic scaling of oxytetracycline*. *J.Pharm Sci.*, 2002. **91**(2): p. 331-341.
127. Martin-Jimenez, T. and J.E. Riviere, *Mixed effects modeling of the disposition of gentamicin across domestic animal species*. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, 2001. **24**(5): p. 321-332.
128. Cummings, L.E., et al., *Pharmacokinetics of gentamicin in newborn to 30-day-old foals*. *Am J Vet Res*, 1990. **51**(12): p. 1988-92.
129. Xie, C.X., L.T. Piecoro, and D.P. Wermeling, *Gender-related considerations in clinical pharmacology and drug therapeutics*. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 1997. **9**(4): p. 459-68.
130. Boothe, D.M., *Factors affecting drug disposition and extrapolation of dosing regimens.*, in *Small animal clinical pharmacology and therapeutics*, D.M. Boothe, Editor. 2001, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 18-40.
131. Baggot, J.D., *Distribution of antimicrobial agents in normal and diseased animals*. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 1980. **176**(10 Spec No): p. 1085-1090.
132. D'Espine, M., et al., *Serum levels of ciprofloxacin after single oral doses in patients with septicemia*. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 1989. **8**(12): p. 1019-1023.
133. Salam, A.A. and J.D. Baggot, *Influence of induced disease states on the disposition kinetics of imidocarb in goats*. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, 1986. **9**(2): p. 192-197.
134. Rao, G.S., et al., *Effects of endotoxin-induced fever and probenecid on disposition of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravascular administration of enrofloxacin in goats*. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, 2000. **23**(6): p. 365-372.
135. Pennington, J.E., et al., *Gentamicin sulfate pharmacokinetics: lower levels of gentamicin in blood during fever*. *J.Infect.Dis.*, 1975. **132**(3): p. 270-275.
136. Zeng, Z.L. and K.F. Fung, *Effects of experimentally induced Streptococcus suis infection on the pharmacokinetics of penicillin G in pigs*. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, 1990. **13**(1): p. 43-48.
137. Zeng, Z.L. and K.F. Fung, *Effects of experimentally induces Escherichia coli infection on the pharmacokinetics of enrofloxacin in pigs*. *J.Vet.Pharmacol.Ther.*, 1997. **20**(suppl.1): p. 39-40.
138. Post, L.O., et al., *The effect of endotoxin and dexamethasone on enrofloxacin pharmacokinetic parameters in swine*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **304**(2): p. 889-95.
139. Waxman, S., et al., *Influence of Escherichia coli endotoxin-induced fever on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous administration in goats*. *J Vet Pharmacol Ther*, 2003. **26**(1): p. 65-9.

140. Riviere, J.E., *Population pharmacokinetic models and bayesian forecasting applied to clinical pharmacokinetics*, in *Comparative pharmacokinetics*. 1999, Iowa State Press: Ames, Iowa. U.S.A.
141. Vozeh, S., et al., *The use of population pharmacokinetics in drug development*. *Clin.Pharmacokinet.*, 1996. **30**(2): p. 81-93.
142. Jelliffe, R.W., et al., *Individualizing drug dosage regimens: roles of population pharmacokinetic and dynamic models, Bayesian fitting, and adaptive control*. *Ther.Drug Monit.*, 1993. **15**(5): p. 380-393.
143. Riviere, J.E., A.I. Webb, and A.L. Craigmill, *Primer on estimating withdrawal times after extralabel drug use*. *J Am Vet Med Assoc*, 1998. **213**(7): p. 966-8.
144. NCCLS, *National Committee for Clinical Laboratory Standard, Tentative standard M31-A vol.19 N 11*. 1999.
145. Rodvold, K.A. and M. Neuhauser, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones*. *Pharmacotherapy*, 2001. **21**(10 Pt 2): p. 233S-252S.
146. Post, L.O., et al., *Influence of porcine Actinobacillus pleuropneumoniae infection and dexamethasone on the pharmacokinetic parameters of enrofloxacin*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **301**(1): p. 217-22.
147. Monshouwer, M. and R.F. Witkamp, *Cytochromes and cytokines: changes in drug disposition in animals during an acute phase response: a mini-review*. *Vet.Q.*, 2000. **22**(1): p. 17-20.
148. Hirata, C.A., et al., *Steady-state pharmacokinetics of intravenous and oral ciprofloxacin in elderly patients*. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 1989. **33**(11): p. 1927-1931.
149. Hasegawa, T., K. Takagi, and K. Kitaichi, *Effects of bacterial endotoxin on drug pharmacokinetics*. *Nagoya J Med Sci*, 1999. **62**(1-2): p. 11-28.
150. Schentag, J.J., A.K. Meagher, and A. Forrest, *Fluoroquinolone AUIC break points and the link to bacterial killing rates. Part 2: human trials*. *Ann Pharmacother*, 2003. **37**(10): p. 1478-88.