

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire pharmacologie des anti-infectieux (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences Biologiques et Santé (Limoges)
Secteur de recherche : Pharmacologie et sciences du médicament

Présentée par :
Jennifer Tardiveau

Étude du passage des xénobiotiques dans le lait d'animaux de production par une approche Pharmacocinétique Basée sur la Physiologie (PBPK)

Directeur(s) de Thèse :
Nicolas Grégoire, Alexis Viel

Soutenue le 10 décembre 2021 devant le jury

Jury :

Président	Sandrine Marchand	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Rapporteur	Alain Bousquet-Mélou	Professeur, École Nationale Vétérinaire, Toulouse
Rapporteur	Jean-Lou Dorne	Docteur, Autorité Européenne de Sécurité des Aliments, Parme
Membre	Nicolas Grégoire	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Alexis Viel	Docteur en médecine vétérinaire, ANSES, Fougères
Membre	Reynald Magnier	Responsable Unité, Ceva Santé Animale, Libourne
Membre	Anne-Marie Jacques	Docteur, Agence nationale du médicament vétérinaire, Fougères

Pour citer cette thèse :

Jennifer Tardiveau. *Étude du passage des xénobiotiques dans le lait d'animaux de production par une approche Pharmacocinétique Basée sur la Physiologie (PBPK)* [En ligne]. Thèse Pharmacologie et sciences du médicament. Poitiers : Université de Poitiers, 2021. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>



THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire pharmacologie des anti-infectieux (Poitiers)
(Diplôme National- Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences biologiques et santé
Secteur de recherche : Pharmacologie et sciences du médicament

Présentée par

Jennifer Tardiveau

Etude du passage des xénobiotiques dans le lait d'animaux de production par une approche Pharmacocinétique Basée sur la Physiologie (PBPK)

Directeurs de Thèse :
Nicolas Grégoire, Alexis Viel

Soutenue le 10 décembre 2021 devant le jury

Jury :

Président	Sandrine Marchand	Professeur, Université de Poitiers
Rapporteur	Jean-Lou Dorne	Docteur, Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
Rapporteur	Alain Bousquet-Mélou	Professeur, École nationale vétérinaire de Toulouse
Membre	Anne Marie Jacques	Docteur, Agence nationale du médicament vétérinaire
Membre	Michel Laurentie	Directeur de Recherches à l'ANSES
Membre	Reynald Magnier	Responsable Unité, Ceva Santé Animale, Libourne
Membre	Nicolas Grégoire	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Alexis Viel	Docteur, ANSES

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National- Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences biologiques et santé

Secteur de recherche : Pharmacologie et sciences du médicament

Présentée par :

Jennifer Tardiveau

**Etude du passage des xénobiotiques dans le lait d'animaux de production
par une approche Pharmacocinétique Basée sur la Physiologie (PBPK)**

Directeurs de Thèse :

Docteur Nicolas GREGOIRE

Docteur Alexis VIEL

Soutenue le 10 décembre 2021

devant La Commission d'Examen

JURY

Professeur Alain Bousquet-Mélou
Docteur Jean-Lou Dorne
Professeur Sandrine Marchand
Docteur Anne Marie Jacques
Docteur Michel Laurentie
Msc Reynald Magnier
Docteur Nicolas Grégoire
Docteur Alexis Viel

Rapporteur
Rapporteur
Président
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Remerciements

Au Pr Alain Bousquet-Melou, au Dr Jean-Lou Dorne et au Dr Anne Marie Jacques, qui me font l'honneur d'évaluer ce travail. Sincères remerciements.

A Mr Reynald Magnier, pour avoir évalué ce travail, ainsi que d'avoir organisé et réalisé l'ensemble des dosages au sein des laboratoires CEVA. A son équipe, Mr. Christophe Buffet et Mme Balladyne Tritsch.

A Michel Laurentie, pour avoir accepté d'être jury de ce travail. Merci pour toutes tes explications, tes conseils et ton aide. Merci d'avoir répondu présent à l'ensemble des expérimentations animales.

Au Dr Nicolas Grégoire et au Dr Alexis Viel pour avoir porté et encadré cette thèse pendant ces 3 années. Vous formez une super équipe !

Alexis, merci de m'avoir fait découvrir le monde vétérinaire. Merci pour tes conseils, ton suivi et ton aide tout au long de la thèse. Monolix® n'a plus de secrets pour moi maintenant ! Merci d'avoir été présent à toutes les expérimentations animales (malgré les horaires très matinaux) et d'avoir mis en place celle avec les brebis. J'espère qu'elles coulent de beaux jours grâce à la retraite que tu leur as offerte ! Tu as toujours répondu présent pour répondre à mes questions et m'aider en modeling. J'espère que nous aurons d'autres occasions de collaborer à l'avenir. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière.

Nicolas, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour ta patience et ta disponibilité (malgré un planning qui m'a toujours semblé très chargé). Je crois que, comme moi, tu te souviendras longtemps de ces histoires de volumes de lait et de pKa ! Merci d'avoir été calme et rassurant, jusqu'aux dernières semaines intenses de la fin de thèse. Je te transmets ici toute ma reconnaissance.

Au Pr William Couet et au Pr Sandrine Marchand, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe, pour leurs conseils et leur recul sur ce travail.

A toute l'équipe U1070, pour leur accueil, leur partage et leur soutien. Un merci particulier à Miroslava pour ton aide précieuse pour l'organisation de la soutenance de thèse ! A Frédéric, pour ta bonne humeur et ton dynamisme, merci de m'avoir motivée à aller courir ! A Matthieu

Jacobs, bien que tu ne sois plus dans l'équipe, tu m'as soutenue et conseillée pour ma recherche d'emploi. Merci pour ta bienveillance et ta gentillesse.

A l'équipe analytique, en particulier Hélène et Christophe. Vous m'avez formée et fait découvrir la bio analyse (avec ses joies et ses peines). Grâce à vous j'ai pu devenir autonome dans un domaine qui était nouveau pour moi. Je suis heureuse d'avoir pu participer avec vous à la formation sur un nouveau logiciel et d'avoir eu l'honneur d'écrire une nouvelle procédure. J'ai beaucoup appris et grandi à vos côtés.

A la team des (anciens et nouveaux) doctorants : Romain, Mathilde, Noémie, Luc, Zahyra, Rana, Hariyanto, Shachi. A Jeremy, Théo et Clémence (en IUT ou en école d'ingé ?), je vous compte aussi dans la team ! Ces trois années à Poitiers ont été joyeuses et pleines de vie grâce à vous tous. Foutu COVID qui ne nous a pas permis de partager autant de moments qu'on l'aurait souhaité ! Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite. N'oubliez pas, vous êtes les bienvenus à la maison (ou dans notre futur 9 m²) si vous passez par la région PACA !

A toutes les personnes des Lycées agricoles de Venours et de Melle qui ont aidé à la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse : Mélaine Sauvée, Bertrand Minaud, Sylvie Ecal, Emilie Wimmer, Denis Boulanger, Mélanie Bouteille, Jérémy Roger.

Aux équipes ANSES de Fougères et Niort.

A Gaël Touchais, pour cette belle collaboration et pour tous les dosages que tu as faits. J'ai vraiment apprécié travailler avec toi, je te souhaite le meilleur pour la suite. A Marie Pierre Chotard-Soutif, Marie-Pierre Lagrée et Dominique Hurtaud-Pessel pour avoir réalisé l'ensemble des dosages à l'ANSES. Merci aussi de m'avoir accueillie dans votre équipe quand j'étais à Fougères.

A Jean Guy Rolland et Thierry Vidard, pour votre aide précieuse pendant les expérimentations animales. Thierry, merci aussi pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

Un merci particulier à Carine Paraud. Ta sympathie et ta bienveillance m'ont beaucoup touchée. C'est un plaisir de travailler à tes côtés et j'espère que nous aurons l'occasion de nous croiser à nouveau. Merci pour tout.

To Lerica LeRoux-Pullen, Lydia Kuhnert and Ronette Gehring, for these great international collaborations. Sincere thanks.

Pour toutes les rencontres durant ces années de thèse, notamment les formidables équipes de Ma Thèse en 180 Secondes et de Pint of Science.

A Muriel (muumuuu) et Julian. Votre joie de vivre et votre humour (et quel humour...) m'ont accompagnée pendant ces trois années. Mumu, merci pour ces soirées folles entre filles ; reste toujours aussi joyeuse (mais attention à ne pas trop danser sur les tables) ! Vous êtes deux personnes formidables. A bientôt dans le sud !

A Grace. Tu es une artiste et une super scientifique, mais surtout, tu es une formidable partenaire! Avec toi, ces trois années de thèse sont passé beaucoup trop vite, dans la joie (et aussi bien d'autres émotions), l'échange et l'entraide. C'était un plaisir d'avancer à tes côtés. Merci de m'avoir (ré)entraînée dans l'aventure Pint of Science, qui m'a fait grandir et découvrir d'autres domaines. Sache que je te trouve brillante, et que je suis sûre que tu vas vite trouver la voie qui te conviendra le mieux. Garde confiance en toi. J'espère de tout cœur que nous resterons toujours en contact (et peut être qu'un jour j'aurai la chance de rencontrer Théo !). En tous cas, tu sais que tu es la bienvenue dans le sud avec Mumu.

A mes ami-e-s : Alice (ma coach et tellement plus), Wendy (ma dessinatrice hors paire), Floriane, Helena et Camille (mes doctorantes préférées), Nicolas (le seul qui comprenne le but de toutes ces équations !), Guillaume, Emily, JB, Laetitia, Cristina et toute la team de la fac.

A mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans toutes ces années d'études (heureusement que j'étais partie pour des études courtes) ! Je n'en serais pas là sans vous. A mes deux sœurs que j'aime énormément et qui sont toujours là pour moi (vous serez toujours mes modèles dans la vie).

A Julien. « Ma petite étoile, t'es venu briller dans ma vie ». Merci pour tout ce que tu fais pour moi, et pour tout l'amour et le bonheur que tu me donnes. Je serai là pour te soutenir dans tes prochains projets, comme tu as toujours été là pour me soutenir dans les miens. A tous nos projets futurs.

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des publications et communications	9
Liste des abréviations	10
Liste des figures	12
Liste des tableaux	13
Liste des Annexes.....	14
Introduction	15
Première Partie : Contexte scientifique	17
1. Passage des xénobiotiques dans le lait.....	18
1.1. Physiologie de la glande mammaire	18
1.1.1. Anatomie de la glande mammaire	18
1.1.2. Mammogénèse.....	20
1.1.3. Lactogénèse et galactopoïèse.....	20
1.1.4. Involution.....	21
1.2. Production et excrétion du lait	21
1.2.1. Production et composition du lait	21
1.2.2. Variation de la composition du lait.....	25
1.2.3. L'excrétion du lait	28
1.2.4. Volume de lait produit.....	31
1.3. Transporteurs de la glande mammaire	31
1.3.1. Nature et expression des transporteurs	32
1.3.2. Facteurs influençant l'expression des transporteurs	35
1.4. Modèles d'étude du passage des xénobiotiques dans le lait	35
1.4.1. Influence des propriétés physico-chimiques des xénobiotiques.....	35
1.4.2. Ratio M/P.....	38
1.4.3. Modèles non clinique d'étude du passage de xénobiotiques dans le lait.....	39

2.	La modélisation basée sur la physiologie (PBPK)	48
2.1.	Principe de la modélisation PBPK	48
2.2.	Construction d'un modèle PBPK.....	49
2.2.1.	Structure du modèle.....	50
2.2.2.	Implémentation dans un logiciel.....	55
2.2.3.	Paramétrisation du modèle	55
2.3.	Calibration et évaluation du modèle	61
2.3.1.	Calibration et prédiction	61
2.3.2.	Evaluation.....	62
2.4.	Limites des modèles PBPK.....	64
2.5.	Applications	65
2.5.1.	Les modèles PBPK en médecine humaine	65
2.5.2.	Les modèles PBPK en médecine vétérinaire	65
2.5.3.	Modèles PBPK sur le passage dans le lait.....	66
3.	Méthode de dosage des résidus dans le lait	78
3.1.	Principe d'une méthode de dosage en HPLC.....	78
3.1.1.	Détecteur UV	79
3.1.2.	Détecteur de fluorescence.....	79
3.1.3.	Spectromètre de masse en tandem.....	80
3.2.	Validation d'une méthode de dosage	81
3.2.1.	Approche classique.....	82
3.2.2.	Profil d'exactitude	85
4.	Objectifs de la thèse	91
Deuxième Partie : Travaux de recherche		93
5.	Travail expérimental	94
5.1.	Validation d'une méthode de dosage grâce à la méthode globale et quantification des résidus d'un antibiotique et son métabolite dans le lait de trois espèces de production	
	94	
5.1.1.	Introduction	94

5.1.2. Article accepté	94
5.2. Développement d'un modèle PBPK générique et application au passage d'un antibiotique dans le lait de deux espèces de production	132
5.2.1. Introduction	132
5.2.2. Article soumis.....	132
5.3. Comparaison des profils cinétiques de quatre antibiotiques dans le lait de trois espèces de production	187
5.3.1. Introduction	187
5.3.2. Démarche scientifique	187
5.3.3. Résultats.....	192
5.3.4. Discussion et perspectives	196
Troisième partie : Discussion, conclusion et perspectives	202
6. Discussion générale.....	203
7. Conclusion	210
8. Annexes.....	211
Références.....	258
Résumé	275
Abstract	277

Liste des publications et communications

Tardiveau J., Touchais G., Chotard-Soutif MP., Lagrée MP., Hurtaud-Pessel D., Grégoire N., Viel A., Laurentie M. (2021). A liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the quantification of spiramycin and its active metabolite neospiramycin in milk of major and minor species: validation using the accuracy profile. **Accepté dans le Journal of Chromatography B.**

Tardiveau J., LeRoux-Pullen L., Gehring R., Touchais G., Chotard-Soutif MP., Mirfendereski H., Paraud C., Jacobs M., Magnier R., Laurentie M., Couet W., Marchand S., Viel A., Grégoire N. (2021). A Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) model to explore the blood-milk barrier in lactating species: case study with oxytetracycline administered to dairy cow and goat. **Soumis à Food and Chemical Toxicology Journal.**

Tardiveau J., Touchais G., Chotard-Soutif MP., Laurentie M., Paraud C., Mirfendereski H., Magnier R., Marchand S., Couet W., Viel A., Grégoire N. (2021). Blood-milk barrier exploration in lactating species using a Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) model: Case study with oxytetracycline. **E-poster présenté au congrès international Population Approach Group Europe.**

Tardiveau J., Touchais G., Chotard-Soutif MP., Laurentie M., Paraud C., Mirfendereski H., Magnier R., Marchand S., Couet W., Viel A., Grégoire N. (2021). Blood-milk barrier exploration in lactating species using a Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) model: Case study with oxytetracycline. **E-poster présenté au congrès international European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.**

Communication orale à l'EPASG-ISAP symposium (2021).

Communication orale aux Journées thématiques de l'école doctorale (2019, Bellebouches).

Participation au concours Ma thèse en 180 secondes (2019).

Sciences en mouvement d'Elles (2019).

Les printemps de la recherche (2019).

Action + (2019-2020).

Présentation aux laboratoires ANSES de Niort et Fougères (2020).

Liste des abréviations

ABC : ATP-binding cassette
ADME : absorption, distribution, métabolisme et excrétion
AMM : autorisation de mise sur le marché
AUC : aire sous la courbe des concentrations en fonction du temps (*area under the curve*)
BCRP : Breast Cancer Resistance Protein
BL : bêta-lactamines
BP : ratio sang total: plasma (*blood to plasma ratio*)
CES : cellules épithéliales sécrétrices
CL : clairance
CS : standard de calibration
CV : coefficient de variation
EMA : agence européenne des médicaments (*european medicines agency*)
Eq : équation
ER : ratio d'extraction (*extraction ratio*)
EW : eau extracellulaire
 f_{up} : fraction libre plasmatique
GSA : analyse de sensibilité globale (*global sensitivity analysis*)
HBD : donneur de liaison hydrogène (*hydrogen bond donor*)
HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
Ht : hématocrite
IA : intra-artériel
IG : immunoglobulines
IH : inhalation
IIV : variabilité inter-individuelle (*inter individual variability*)
IM : intra-musculaire
IMI : intervalle entre les traites (*inter milking interval*)
IMM : intra-mammaire
IS : standard interne (*internal standard*)
IT : intervalle de tolérance
IV : intra-veineux
IVIVE : extrapolation *in vitro in vivo*
IW : eau intracellulaire
 k_{tissue} : coefficient de partage tissu : sang
LLOQ : plus faible limite de quantification (*lower limit of quantification*)
LMR : limite maximale résiduelle (*maximal residu limit*)
M/P : ratio lait/plasma (*milk plasma ratio*)
MAPE : pourcentage d'erreur absolu moyen (*mean absolute percentage error*)
MDCKII : cellules rénales canines Madin-Darby (*Madin-Darby Canine Kidney*)
MG : matière grasse
MFG : globule gras (*milk fat globule*)
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem
NCA : analyse non compartimentale (*non compartmental analysis*)
NLME : modélisation non-linéaire à effet mixte (*nonlinear mixed effects*)
OTC : oxytétracycline
PAMPA : membrane artificielle parallèle (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*)

Papp : perméabilité
PBPK : pharmacocinétique basé sur la physiologie (*physiologically based pharmacokinetic*)
PK : pharmacocinétique (*pharmacokinetic*)
PM : poids moléculaire
PSA : surface polaire (*polar surface area*)
QSAR : relation quantitative structure-activité (*quantitative structure-activity relationship*)
QSPR : relation quantitative structure-propriété (*quantitative structure-property relationship*)
R² : coefficient de détermination
RCP : résumé des caractéristiques du produit
RE : réticulum endoplasmique poreux
REU : incertitude étendue relative (*relative extended uncertainty*)
SC : sous-cutané
SLC : Solute Carrier
TA : temps d'attente
TB : taux butyreux
TGI : tractus gastro-intestinal
TP : taux protéique
TR : temps de rétention
ULOQ : plus haute limite de quantification (*upper limit of quantification*)
UV : ultra violet
Vasc : espace vasculaire
VICH : Veterinary International Conference on Harmonization
VS : standard de validation (ou QC pour *quality control*)
WHO : organisation mondiale de la santé (*world health organization*)

Liste des figures

Figure 1: Structure de la glande mammaire bovine. -----	19
Figure 2: Procédés de séparation du lait. -----	25
Figure 3: Représentation schématique du transport à travers la barrière sang-lait par cinq mécanismes. -----	29
Figure 4: Représentation schématique des principaux transporteurs de la barrière sang-lait. -	33
Figure 5: Représentation schématique de la distribution d'un xénobiotique, d'une base et d'un acide entre le plasma et le lait. -----	37
Figure 6: Représentation schématique du modèle <i>in vitro</i> de membrane artificielle PAMPA.	40
Figure 7: Organigramme pour le développement, la calibration, l'évaluation et l'application d'un modèle PBPK. -----	49
Figure 8: Exemple de modèle PBPK complet. -----	50
Figure 9: Modèles PBPK à débit limité, à perméabilité limitée avec deux ou trois compartiments. -----	52
Figure 10: Schéma de la distribution d'un xénobiotique dans un tissu et dans un érythrocyte, suivant les hypothèses de Rodgers et Rowland.-----	57
Figure 11: Modèle PBPK de l'excrétion lactée de la flunixin chez la vache développé par Leavens. -----	67
Figure 12: Modèles de la glande mammaire à 1 compartiment ou 2 compartiments développés par Li.-----	69
Figure 13: Modèle PBPK de l'administration IMM de trois bêta-lactames chez la vache développé par Woodward. -----	73
Figure 14: Modèle PBPK de l'administration IMM et IV de pirlimycine chez la vache développé par Woodward. -----	75
Figure 15: Principe de la chromatographie liquide à haute performance. -----	79
Figure 16: Principe du spectromètre de masse en tandem -----	80
Figure 17: Illustration de la méthodologie de caractérisation des caractéristiques de performance étudiées séparément ou basée sur un critère unique. -----	82
Figure 18: Composantes croissantes de la variabilité : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité. -----	83

Figure 19: Représentation schématique d'une méthode de dosage juste mais pas fidèle, fidèle mais pas juste ou exacte en fonction de la distribution des essais. -----	84
Figure 20: Représentation schématique de l'approche classique et du profil d'exactitude à une concentration donnée. -----	86
Figure 21: Représentation schématique d'un profil d'exactitude et des indices associés. ----	87
Figure 22: Comparaison de la validation de méthodes analytiques par une approche classique et une approche globale. -----	90
Figure 23: Objectifs de la thèse. -----	92
Figure 24: Structure chimique des quatre antibiotiques et le pKa de leur principale fonction acide ou basique.-----	188
Figure 25: Processus expérimental. -----	189
Figure 26: Concentrations plasmatiques et laitières des quatre antibiotiques en fonction du temps chez les vaches, les chèvres et les brebis. -----	194
Figure 27: Résultats du test d'accumulation de Hoechst 33342 dans des cellules MDCKII transfectées avec BCRP _{bovine} en présence de concentrations croissantes de marbofloxacin.196	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Variation de la composition du lait entre les ruminants domestiques.-----	26
Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques des quatre antibiotiques : amoxicilline, marbofloxacin, oxytétracycline et spiramycine. -----	187
Tableau 3 : Caractéristiques des méthodes de dosage des quatre antibiotiques dans le plasma et le lait des trois espèces. -----	190
Tableau 4 : Caractéristiques démographiques des vaches, des chèvres et des brebis de l'étude. -----	192
Tableau 5 : Résultats de l'analyse non-compartimentale des quatre antibiotiques dans le plasma et le lait de chèvre, vache et brebis. -----	193
Tableau 6 : Résultats de perméabilité transcellulaire des quatre antibiotiques estimée par le système <i>in vitro</i> de membrane artificielle. -----	195
Tableau 7 : Résultats des calculs des ratios M/P des quatre antibiotiques de ce travail à partir de différents modèles <i>in silico</i> . -----	206

Liste des Annexes

Supplementary Materials A <i>Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Model to Explore the Blood-Milk Barrier in Lactating Species: Case Study with Oxytetracycline Administered to Dairy Cow and Goat</i> -----	211
--	-----

Introduction

L'évaluation des risques chimiques est un enjeu majeur dans la sécurité sanitaire des denrées alimentaires. Pour cela, des niveaux de sécurité ont été définis afin de protéger les humains d'une exposition à des résidus (médicaments ou polluants) présents dans les aliments consommés. Ainsi, pour chaque principe actif dans chaque denrée d'origine animale, une limite maximale de résidu (LMR) est définie, représentant la concentration maximale d'un résidu autorisée dans la denrée qui ne présente pas de risque sanitaire pour le consommateur. Afin de protéger le consommateur les autorités sanitaires fixent un temps d'attente (TA) pour chaque denrée : il s'agit du temps jugé nécessaire (après exposition) pour que la concentration du résidu dans la denrée soit inférieure à la LMR.

La présence de résidus de xénobiotiques dans le lait a notamment un impact économique important puisqu'après exposition à la substance active, et pendant la totalité du TA, le lait produit par les animaux d'élevage doit être jeté. De plus, les TA ne sont pas obligatoirement bien définis pour les espèces mineures telles que les chèvres, mais sont souvent extrapolés à partir de données observées chez des espèces majeures (vache), faute d'expérimentation chez l'espèce cible par les industriels du médicament. Ces extrapolations peuvent alors entraîner une surestimation du TA réel qui devrait être défini chez l'espèce mineure, dans un souci de protection du consommateur, et ainsi le rejet d'un lait contenant des concentrations inférieures à la LMR. Aussi, la compréhension du passage et de la persistance des xénobiotiques dans le lait est essentielle pour mieux maîtriser ces résidus, et optimiser les TA afin de réduire ces pertes.

Pour déterminer la concentration d'un résidu dans un échantillon de lait, il est nécessaire de développer et valider une méthode de dosage. Celle-ci doit être spécifique de la molécule d'intérêt et rendre des résultats les plus exacts possible. Une fois le résidu quantifié dans le lait, il existe différentes méthodes *in silico* pour décrire l'évolution de sa concentration au cours du temps au sein de l'organisme (animal producteur de lait) et sa persistance dans le lait.

L'utilisation, en pharmacologie, de techniques informatiques pour le développement de modèles, permet de décrire la distribution des xénobiotiques au sein d'un organisme. Les modèles pharmacologiques basés sur la physiologie (PBPK) ont la capacité d'intégrer la physiologie des organismes ainsi que les propriétés des molécules, pour prédire leur distribution

dans les tissus ou les bio-fluides tels que le lait. Ces modèles prédictifs permettent ensuite d'extrapoler les cinétiques à d'autres molécules et dans le lait de différentes espèces. Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte.

La première partie de ce travail est une synthèse bibliographique qui décrit, d'une part, la physiologie de la lactation et l'étude du passage de molécules à travers la barrière sang-lait, (chapitre 1) et, d'autre part, la modélisation basée sur la physiologie (PBPK) et son application pour évaluer le passage de xénobiotiques dans le lait (chapitre 2) ; puis le développement et la validation de méthodes de dosage permettant de quantifier les résidus de xénobiotiques dans le lait sont exposés (chapitre 3). Cette synthèse est suivie d'une présentation des expérimentations qui ont été menées, pour (i) développer une méthode de dosage d'un antibiotique et son métabolite actif dans le lait de trois espèces animales ; (ii) développer un modèle PBPK générique de l'excrétion lactée des xénobiotiques et son application à un antibiotique dans le lait de plusieurs espèces ; et (iii) étudier la cinétique de quatre antibiotiques aux propriétés physico-chimiques distinctes dans le plasma et le lait de trois espèces animales. La thèse se termine par une discussion générale de ces travaux ainsi que les perspectives proposées sur le sujet.

Première Partie :

Contexte scientifique

1. Passage des xénobiotiques dans le lait

1.1. Physiologie de la glande mammaire

1.1.1. Anatomie de la glande mammaire

La mamelle, commune à tous les mammifères, a pour rôle de synthétiser et de sécréter le lait à la naissance du nouveau-né. Elle est composée de plusieurs glandes séparées par du tissu conjonctif. A titre d'exemple, les vaches possèdent 4 glandes, les chèvres, les brebis et les humains en ont 2, tandis que les cochons en comptent 12 (Nickerson, 2011).

Les **glandes** sont chacune constituées de tissu sécrétoire (parenchyme), de tissu conjonctif, adipeux et musculaire, de ligaments et d'un réseau important de vaisseaux sanguins et de nerfs. Leur taille dépend de la quantité de l'ensemble des tissus, tandis que leur productivité (volume de lait produit) dépend de la proportion du tissu sécrétoire par rapport aux autres tissus (et de la différenciation des cellules) (Akers, Capuco and Keys, 2006). Leur localisation varie suivant les espèces : les ruminants possèdent des glandes inguinales, maintenues à la paroi ventrale par des ligaments attachés à l'os pelvien et à des tendons des muscles abdominaux, tandis que les humains possèdent des glandes thoraciques (Campbell and Marshall, 2016).

Chaque glande est constituée de plusieurs **lobules** eux-mêmes composés de millions d'alvéoles. Les **alvéoles** sont des structures sphériques microscopiques dont le diamètre varie de 50 à 250 µm en fonction du volume de lait accumulé. Elles sont reliées par des **canaux** à la **citerne**, lieu de stockage du lait chez les ruminants, puis au **trayon**, d'où le lait est extrait (Campbell and Marshall, 2016). Une monocouche de cellules épithéliales sécrétrices (**CES**) forme le revêtement interne des alvéoles. Elles ont pour rôle de synthétiser le lait. Les CES sont reliées entre elles au niveau apical par des **jonctions serrées** qui empêchent les échanges paracellulaires entre le sang et le lait (Nguyen and Neville, 1998; Gehring and Smith, 2006). Au niveau basal, elles sont en contact avec des cellules myoépithéliales et une membrane basale qui les sépare du stroma vascularisé contenant des adipocytes et des fibroblastes et du système vasculaire (McManaman and Neville, 2003) (voir Figure 1).

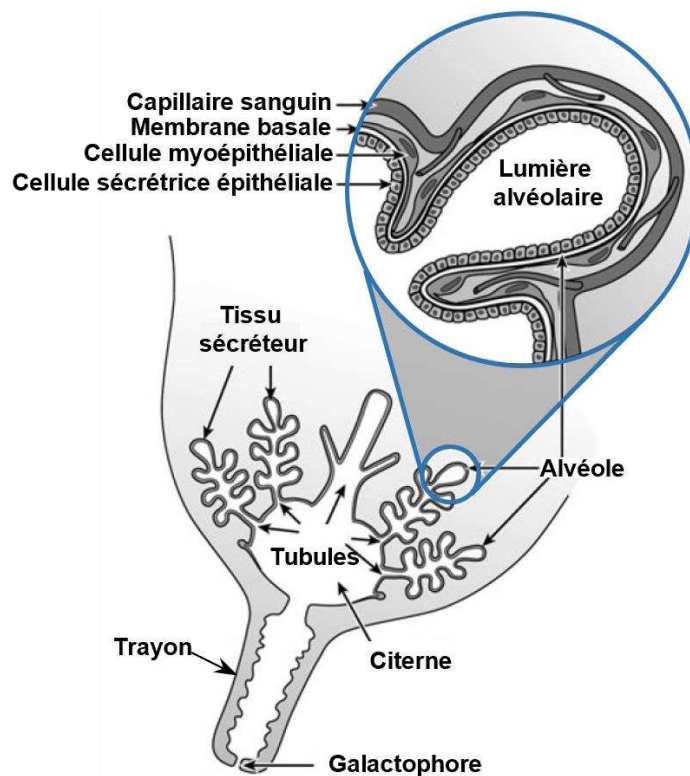


Figure 1: Structure de la glande mammaire bovine.
Adapté de (Gehring and Smith, 2006).

Les ruminants ont une citerne et un système de canaux très développé qui leur permet de stocker de grandes quantités de lait. Avant la traite, environ 60% du lait est conservé dans la lumière des alvéoles et les petits canaux et 40% est stocké dans les grands canaux et la citerne (Nickerson, 2011). La capacité de stockage de la citerne varie entre les espèces et les races mais également suivant la fréquence de traite (Ayadi *et al.*, 2003). Elle peut contenir entre 181 et 743 ml de lait chez une chèvre Murciano-Granadina (Salama *et al.*, 2004), de 316 ml chez une brebis Manchega à 888 ml chez une brebis Lacaune (Castillo *et al.*, 2008), tandis que la citerne de la vache a une capacité de 400 à 500 ml (Whittem, 2012). Les ouvertures par trayon, appelés **galactophores**, varient également avec une seule pour les ruminants contre 15-25 pour les humains (Larson, 1978; Nickerson, 2011).

Chez les ruminants, les glandes sont reliées à la cavité abdominale par des canaux inguinaux, permettant le passage des vaisseaux sanguins et lymphatiques dans la mamelle (Nickerson, 2011). Deux artères (provenant initialement de l'aorte postérieure dorsale abdominale) réparties dans les moitiés droite et gauche de la mamelle, permettent l'apport d'oxygène et de nutriments. Elles se divisent en artères antérieures et postérieures et se

ramifient en artérioles puis en capillaires pour former un réseau entourant les alvéoles. Ce réseau de capillaires artériels fournit aux CES un apport continu de précurseurs nécessaires pour la synthèse du lait (Prosser, 1996). Les échanges de sang veineux se font également par un système de capillaires constitué de deux veines principales, de veines abdominales sous-cutanées et de veines pelviennes (Campbell and Marshall, 2016).

Le système lymphatique est également présent dans la glande et relie les ganglions lymphatiques supra mammaires, sources de lymphocytes en cas d'infection, à la glande. Le système nerveux est principalement composé de nerfs sensoriels et sympathiques. Ces derniers, contrôlant le diamètre des artères et ainsi le débit sanguin de la mamelle, sont essentiels pour la libération des hormones vers la mamelle (Campbell and Marshall, 2016).

1.1.2. Mammogénèse

Le développement de la glande mammaire (mammogénèse) a lieu en plusieurs cycles. Lors de la croissance du jeune animal, la structure tissulaire (tissu adipeux et conjonctif, trayons, citerne) s'agrandit proportionnellement à la taille de l'animal, grâce à une réplication massive des cellules épithéliales. Lors de la puberté, le système principal de canaux se développe, stimulé par la production d'œstrogène. Lors de la gestation, c'est le système lobules-alvéoles et les canaux fins qui se développent sous l'action de facteurs de croissance et de facteurs hormonaux tels que la progestérone. C'est à la fin de la gestation que l'organe se différencie en glande exocrine fonctionnelle, pour être capable de sécréter du lait à la mise bas (Akers and Capuco, 2011; Campbell and Marshall, 2016).

1.1.3. Lactogénèse et galactopoïèse

Le système hormonal endocrine joue un rôle important sur l'initiation de la sécrétion de lait (lactogénèse) et son maintien (galactopoïèse). En effet, l'œstrogène produit à la fin de la gestation stimule la sécrétion de **prolactine**, hormone responsable de l'augmentation de l'activité enzymatique des CES (mais aussi du développement des canaux et des alvéoles et de la différenciation des CES), qui permet aux cellules de convertir les composants sanguins en constituants du lait. Par la suite, la sécrétion de prolactine est stimulée par la traite (Akers and Capuco, 2011).

La **lactogénèse I** (phase d'initiation) commence au milieu de la gestation. Elle correspond à l'augmentation de l'expression des gènes des protéines du lait et d'enzymes, ainsi que l'accumulation de gouttelettes de lipides (McManaman and Neville, 2003). A cette étape, une faible quantité de CES devient capable de sécréter, de façon limitée, quelques composants du lait. La **lactogénèse II** (phase de différenciation), qui a lieu après la mise bas, est caractérisée par l'induction et l'expression homogène de gènes de protéines du lait et d'enzymes par l'ensemble des CES, la maturation de certains organites et transports cellulaires ainsi que de la fermeture des jonctions serrées. Le lait, produit en grande quantité, est libéré dans la lumière des alvéoles puis remplit progressivement tout le système de canaux ainsi que la citerne et les trayons. L'accumulation du lait dans la lumière entraîne un mécanisme de rétroaction négatif, qui peut être évité en diminuant l'intervalle de traite (Stelwagen, 2001).

La **galactopoïèse** dépend principalement des taux de sécrétion de trois hormones : la prolactine, la thyroxine et la somatotropine (hormone de croissance). Certains facteurs tels que l'âge, la santé de l'animal et la saison influencent également la persistance de la production de lait (Campbell and Marshall, 2016).

1.1.4. Involution

A la fin de la lactation, l'**involution** des glandes est provoquée par l'apoptose (ou mort programmée) des CES et un remodelage du tissu où le tissu conjonctif augmente au détriment du parenchyme. Lorsque les CES ne sont plus vidées, la pression intra-mammaire augmente et engendre la rétractation des capillaires sanguins et ainsi la rétention des constituants plasmatiques dans le sang et la cessation de la sécrétion du lait. L'apoptose des CES est activée et les débris cellulaires sont phagocytés (Campbell and Marshall, 2016).

1.2. Production et excrétion du lait

1.2.1. Production et composition du lait

Le lait est une émulsion de gouttelettes grasses dans un corps aqueux (environ 87% d'eau) contenant des protéines, glucides, minéraux, carbohydrates et autres constituants. Son pH se situe autour de 6,5 et 6,7 chez les espèces domestiques courantes. Il est synthétisé par

deux processus principaux: la **filtration** de certains constituants du système vasculaire et la **synthèse** par les mécanismes cellulaires au sein des CES (McManaman and Neville, 2003).

1.2.1.1. Les protéines

Les protéines majeures du lait sont la caséine, la lactalbumine et la lactoglobuline. Elles sont synthétisées par la glande, dans le réticulum endoplasmique poreux (RE) des CES, à partir d'acides aminés précurseurs dérivés du sang. L'albumine et les immunoglobulines (IG), elles, diffusent librement dans le lait à partir du sang. Une faible proportion d'IG est synthétisée par des lymphocytes (immunité locale de la glande).

La **caséine** existe sous plusieurs formes : α_1 , α_2 , β , κ dont la proportion varie selon les espèces. Son rôle est de transporter du calcium et du phosphore (insolubles) sous forme soluble jusqu'à l'estomac des nouveau-nés. La fixation (fixations covalentes et électrostatiques) de ces trois composants crée des sous-micelles qui se fixent à du phosphate de calcium colloïdal pour former des **micelles**, pouvant atteindre entre 0,03 et 0,3 μm de diamètre. La caséine précipite à pH 4,6, ce qui permet de la séparer des protéines du **lactosérum** -ou protéines solubles- (principalement des β -lactoglobuline, α -lactalbumine, albumine et IgG1, G2, A, M).

Le taux de protéines dans le lait peut être mesuré par la méthode de Kjeldahl qui consiste à transformer l'azote (94% de l'azote est contenu dans les protéines) en ammoniac dosé par titrage, colorimétrie ou potentiométrie (Campbell and Marshall, 2016).

Quelques **enzymes** telles que des phosphatases, estérases, protéases, catalases, peroxydases sont également présentes dans le lait. Elles permettent de dégrader les protéines en peptides de différentes tailles (2 à 20 acides aminés) et compositions qui ont des fonctions biologiques variées (signalisation cellulaire, réponse immunitaires etc.) mais aussi de métaboliser certains xénobiotiques présents dans le lait (McManaman and Neville, 2003). Elles sont détruites par la chaleur et donc lors de la pasteurisation du lait (Campbell and Marshall, 2016).

1.2.1.2. Les glucides et carbohydrates

Le **lactose** est le principal carbohydrate du lait. Il est synthétisé à partir de **glucose** provenant du sang et de **galactose** (provenant d'une molécule de glucose) grâce à l'action de la lactose synthétase (composée de α -lactalbumine et de galactosyl-transférase). La principale

fonction du lactose est de réguler la teneur en eau (osmose) et, par conséquent, de réguler la production de lait.

1.2.1.3. La matière grasse

Plus de la moitié de la matière grasse (**MG**), ou taux butyreux (TB), du lait est synthétisée par la glande mammaire, dans le RE des CES, à partir d'acides gras et de glycérol grâce à l'action d'une acyl-transférase (enzyme liée à la membrane).

La MG est constituée principalement de molécules de **triacylglycérol**, composées de 3 acides gras liés à un squelette de glycérol. Les triacylglycérol sont insolubles, ils s'agrègent en microgouttelettes puis sont relâchés dans le cytoplasme des CES où ils se lient à des protéines et des lipides. Ces agrégats forment alors de grosses gouttelettes qui sont transportées à la membrane apicale des cellules où elles se lient à d'autres protéines et des phospholipides pour former une membrane externe et créer des globules gras (**MFG** pour *milk fat globule* en anglais) (Mather and Keenan, 1998; Evers, 2004). Ces MFG peuvent faire entre 4 et 10 µm de diamètre (Campbell and Marshall, 2016) et sont métaboliquement actifs (contiennent des enzymes de type oxydase, réductase, hydrolase) (McManaman and Neville, 2003). Certaines protéines complexées à des carbohydrates peuvent s'adsorber à leur surface. Ce phénomène est spécifique aux CES mais nécessite beaucoup d'énergie à la glande et une alimentation appropriée pour préserver la quantité de MG dans le lait.

Les **phospholipides** représentent 0,2 à 1 % des lipides. Leur tête hydrophile contient un groupe phosphate chargé négativement.

Le **cholestérol** représente lui 0,3 à 0,4 % de la MG. C'est un constituant des membranes biologiques et un précurseur dans la synthèse d'hormones et de vitamines. Il fait partie des MFG et est issu à 80 % du sang (Ontsouka, 2014).

1.2.1.4. Les minéraux et vitamines

Les minéraux et vitamines sont dérivés du sang et atteignent le cytoplasme des CES par filtration. Leur concentration dans le lait dépend de leur apport par l'alimentation.

Les minéraux essentiels sont le potassium, le calcium, le magnésium, le zinc et le phosphate. Ils sont présents en solution sous forme de sels et fixés dans les micelles de caséine. Le **calcium** est présent sous trois formes dans le lait : 1/3 du calcium est soluble, libre et ionisé,

ou complexé aux anions phosphates et citrates, et 2/3 du calcium est fixé dans les micelles (Neville and Watters, 1983).

La concentration en vitamine B (hydrosoluble) est constante tandis que celle en vitamines A et D (liposoluble) dépend des quantités absorbées et stockées dans le reste du corps.

1.2.1.5. Les cellules somatiques et hormones

Des CES (environ 0,007% des CES de la mamelle) (Campbell and Marshall, 2016), des cellules immunitaires (leucocytes, macrophages, neutrophiles), des érythrocytes dans certains cas sont retrouvées dans le lait et dénommées **cellules somatiques**. Leur nombre dans le lait est un témoin de l'infection de la glande. A ceci s'ajoute la présence de bactéries, moins de 300/ml pour un animal non infecté jusqu'à plus de 1 million/ml en cas d'infection. Les leucocytes sanguins peuvent traverser les barrières mammaires, par passage paracellulaire (Rainard, 2017) ou en poussant les CES directement dans la lumière (Linn, 1988). Les CES dans le lait proviennent également d'un mécanisme de régulation (ou turn over) du nombre de cellules de la glande (Herve *et al.*, 2018).

Certaines hormones ainsi que des cytokines et des facteurs de croissance peuvent aussi être trouvés sous forme de traces dans le lait (Campbell and Marshall, 2016).

1.2.1.6. Les différentes phases du lait

Les composants du lait peuvent être séparés en plusieurs phases, utilisées pour la fabrication des différents produits lactés (voir Figure 2). La **crème** contenant la matière grasse (fabrication du beurre) et le **lait écrémé** (fabrication du yaourt) sont séparés par centrifugation. La coagulation du lait écrémé par ajout de présure (coagulant constitué d'enzymes, extrait de plantes ou de la caillette de veau, qui acidifie le lait) suivi d'une centrifugation permet de séparer le **lait caillé** (fabrication du fromage) qui correspond aux micelles de caséines précipitées et le **lactosérum** contenant les protéines et autres constituants solubles. Enfin, une ultrafiltration du lactosérum permet de séparer les protéines solubles de la fraction aqueuse (Shappell *et al.*, 2017; Lupton *et al.*, 2018).

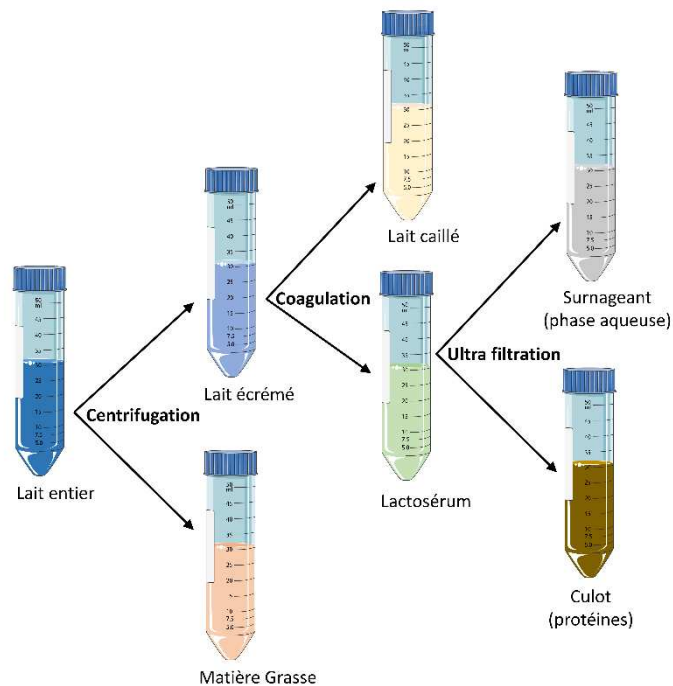


Figure 2: Procédés de séparation du lait.
Adapté de (Shappell et al., 2017). Créé sur smart.servier.com.

1.2.2. Variation de la composition du lait

Différents facteurs peuvent faire varier les constituants du lait.

1.2.2.1. La génétique

De manière générale, le patrimoine génétique intervient dans les effets hormonaux et est un des principaux facteurs qui influence la composition du lait. C'est pourquoi des différences peuvent exister entre espèces, races et individus (Linn, 1988).

Pour résumer les différences entre ruminants domestiques (voir Tableau 1), le lait de **brebis** contient plus de MG et de matières solides (protéines, lactose, minéraux, vitamines) que celui des autres ruminants domestiques et est donc plus calorique. Le lait de **chèvre** comprend moins de lactose et de caséine que celui de la vache mais plus de protéines solubles, de minéraux et de vitamines (vitamine A en particulier). La proportion des différentes formes de caséine change aussi (proportion plus élevée de κ et β -caséine chez la chèvre mais plus faible de α s1-caséine par rapport à la vache), ce qui implique des différences au niveau des structures des

micelles de caséine et des propriétés du lait. En moyenne le pH du lait de chèvre est très légèrement plus faible que celui des autres ruminants (Park *et al.*, 2007; Balthazar *et al.*, 2017).

Tableau 1 : Variation de la composition du lait entre les ruminants domestiques.

		Vache	Chèvre	Brebis
Composition				
Eau (%) ¹		88	88	83
Matière grasse (%) ¹		3,3	3,8	5,9
Lactose (%) ¹		4,7	4,1	4,8
Protéines ¹	Protéines totales (%)	3,4	3,7	5,5
	Albumine, globuline (%) ²	0,6	0,6	1
	Caséine (%)	3,0	2,4	4,7
	α 1-caséine (% caséine totale)	39,7	5,6	6,7
	α 2-caséine (% caséine totale)	10,3	19,2	22,8
	β -caséine (% caséine totale)	32,7	54,8	61,6
	κ -caséine (% caséine totale)	11,6	20,4	8,9
Calcium (%) ¹		0,11	0,13	0,20
Magnésium (%) ¹		0,011	0,015	0,02
Vitamines ¹	Vitamine A (µgRE/100g)	37	54	64
	Vitamine E (mg/100g)	0,08	0,04	0,11
	Vitamine B6 (mg/100g)	0,04	0,05	0,07
	Vitamine B12 (µg/100g)	0,5	0,065	0,66
	Vitamine C (mg/100g)	1,0	1,3	4,6
	Vitamine D (µg/100g)	0,2	0,15	0,2
Propriétés				
Densité ²		1,031	1,034	1,037
pH ²		6,68	6,65	6,68

RE : rétinol

¹(Balthazar *et al.*, 2017) , ²(Park *et al.*, 2007)

1.2.2.2. La nutrition

Le régime alimentaire, qui régule la disponibilité des nutriments et précurseurs, est un facteur important de la composition du lait. Il influence également l'énergie utilisable pour la synthèse de molécules (notamment des MFG) (Linn, 1988). Le soja, par exemple, est très utilisé comme source de protéines dans la nourriture animale et contient des flavonoïdes tels que la

daidzéine et la génistéine qui inhibent un transporteur de la glande mammaire (BCRP, voir section 1.3.1.1) et réduisent la sécrétion de ses substrats dans le lait (Merino *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2013).

1.2.2.3. L'état pathologique

Lors d'une mammite (inflammation de la mamelle), la MG (max -10%), le lactose (max -15%) et les minéraux (calcium, phosphore et par conséquent les micelles) diminuent (Linn, 1988). Le taux de protéines totales peut rester identique mais la proportion de chaque type de protéines est modifiée : les protéines synthétisées par la mamelle diminuent et les protéines sanguines augmentent (perte des jonctions entre les cellules et augmentation de la perméabilité membranaire). Le nombre de cellules somatiques et les taux de sodium et de chlore augmentent à l'inverse du taux de potassium. Le pH du lait augmente également lors d'une mammite (Gehring and Smith, 2006).

1.2.2.4. L'âge, le nombre de lactations et de parturitions

Avec l'âge et le nombre de parturitions, le rendement laitier est augmenté mais les taux de MG et de protéines (caséine et protéines du lactosérum à cause de la détérioration du tissu) diminuent. Chez les vaches, le volume de lait atteint un maximum au bout de 4 à 5 mises bas (Gehring and Smith, 2006).

1.2.2.5. La fréquence de traite

Plus l'intervalle de traite est court, plus le pourcentage de MG est élevé (puisque la pression intra mammaire diminue, facilitant le passage des MFG dans la lumière). Le pourcentage de protéines n'est en revanche pas modifié (Linn, 1988). La diminution de l'intervalle de traite entraîne également une augmentation de l'activité des CES et de la production de lait (Stelwagen, 2001).

1.2.2.6. Le stade de lactation

Lors des premiers jours de lactation (~36h après la mise bas), la barrière sang-lait est partiellement ouverte, permettant les échanges entre le sang et le lait (Nguyen and Neville, 1998). Ainsi, le **colostrum** (premier lait) est riche en α -lactalbumine, en albumine, en Ig et en cellules somatiques (Wall *et al.*, 2015) et a un taux de MG, de protéines (riche en Ig) et de

minéraux plus élevé que le lait mature. La MG diminue pendant les 2 premiers mois de lactation puis augmente lentement au cours de la lactation (car les MFG sont piégés dans les alvéoles). Les taux de protéines et de minéraux chutent jusqu'à atteindre un minimum au bout de 5 à 10 jours (lors pic de production de lait) puis augmentent progressivement (Linn, 1988).

1.2.2.7. La saison

Le pourcentage de MG, de protéines et de certains minéraux est plus élevé en automne et en hiver qu'au printemps et en été. Cela peut néanmoins être modifié par le régime alimentaire ou le pâturage au printemps (Linn, 1988). La production de lait est également plus élevée en hiver car la production de thyroxine, hormone augmentant le taux de sécrétion du lait, est accrue.

1.2.3. L'excrétion du lait

1.2.3.1. Principaux moyens de sécrétion

Plusieurs membranes séparent le système sanguin et le lait : les membranes des vaisseaux sanguins, la membrane basale séparant le stroma et les CES, les membranes basale et apicale des CES et les jonctions serrées entre les CES qui empêchent le passage paracellulaire (Gehring and Smith, 2006). Pourtant différents moyens transcellulaires (i à iv) et paracellulaires (v) existent pour permettre aux composants du lait d'entrer dans la lumière des alvéoles (voir Figure 3) (McManaman and Neville, 2003; Montalbetti *et al.*, 2014; Campbell and Marshall, 2016). La diffusion passive membranaire est probablement un autre mécanisme transcellulaire important de transport pour les composés relativement lipophiles (Ventrella *et al.*, 2019).

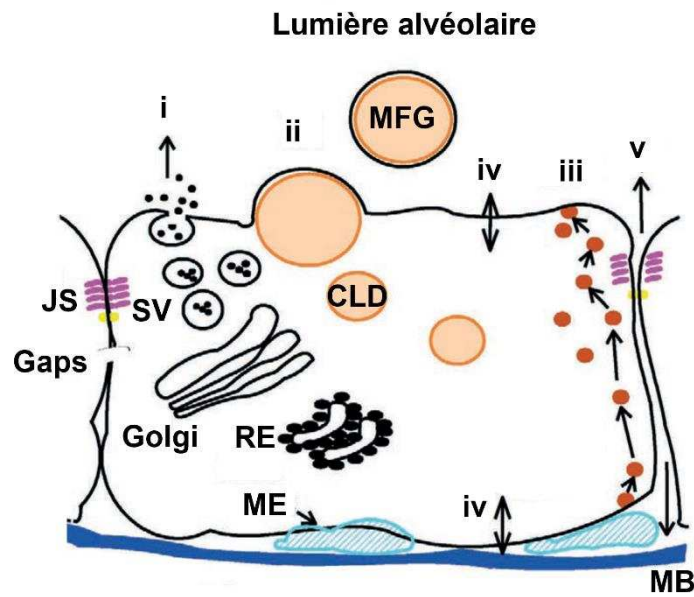


Figure 3: Représentation schématique du transport à travers la barrière sang-lait par cinq mécanismes : (i) exocytose, (ii) voie des lipides, (iii) transcytose vésiculaire, (iv) transport membranaire, (v) voie paracellulaire. Abréviations : SV, vésicule sécrétrice ; RE, réticulum endoplasmique ; MB, membrane basale ; JS, jonctions serrées, Gaps : jonction gap ; ME : cellule myoépithéliale, MFG : milk fat globule, CLD : gouttelette lipidique cytoplasmique. Adapté de (McManaman and Neville, 2003).

(i) **L'exocytose** (ou voie du Golgi) est la voie principale de sécrétion des protéines, glucides (lactose et oligosaccharides), eau et sels minéraux dans le lait. Les molécules sont empaquetées dans des vésicules sécrétrices au sein de l'appareil de Golgi puis sont transportées à la région apicale des CES où elles fusionnent avec la membrane apicale et déversent leur contenu dans la lumière des alvéoles. Le calcium est transporté du cytoplasme aux vésicules sécrétrices par une pompe ATP dépendante trouvée dans l'appareil de Golgi (Virk, Kirk and Shears, 1985). C'est au sein de ces vésicules que le calcium, le phosphate et la caséine forment des micelles.

(ii) **La voie des lipides** est un mécanisme propre au CES de la glande mammaire (Mather and Keenan, 1998). Après avoir encapsulé du cytoplasme et avoir été entourés de la membrane apicale, les MFG sont expulsées de la cellule. Ils permettent ainsi le passage dans le lait de nombreuses substances contenues dans le cytoplasme tels que des hormones, des facteurs de croissance et des xénobiotiques (Shennan and Peaker, 2000).

(iii) **La transcytose** est une voie souvent utilisée dans le transport de macromolécules (IG, transferrines, prolactine) (Monks and Neville, 2004). Les protéines et macromolécules sont endocytées et forment un endosome (compartiment lié à la membrane basale des cellules) qui fusionne avec un lysosome (vacuole qui contient des enzymes) pour la dégradation des substances ou leur recyclage au niveau apical par exocytose. Cette voie permet également le transport dans le lait de xénobiotiques (fixés aux lipoprotéines) (McManaman and Neville, 2003).

(iv) **Le transport membranaire** permet le passage d'ions et de petites molécules telles que le glucose et les acides aminés, par des transporteurs spécifiques (transporteurs actifs, pores ou canaux ioniques) situés à la membrane des CES, de l'appareil de golgi ou des vésicules (Shennan, 1998, 2008). Par exemple, le calcium est véhiculé dans les vésicules de Golgi par l'adénosine triphosphatase de calcium (Neville and Watters, 1983; Montalbetti *et al.*, 2014) et le glucose dans le cytoplasme par GLUT1 (Camps *et al.*, 1994). Des transporteurs membranaires sont également à l'origine du passage dans le lait du cholestérol (Ontsouka, 2014). Cette voie est également utilisée pour le passage de xénobiotiques dans le lait.

(v) **Le transport paracellulaire** permet le mouvement mono ou bi-directionnel de molécules de faible poids moléculaire entre le stroma et la lumière alvéolaire. Ce transport est possible uniquement pendant la gestation car la progestérone, produite pendant la gestation, semble inhiber la fermeture des jonctions serrées (Nguyen and Neville, 1998). A l'inverse, la prolactine, produite lors de la lactation, semble jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité des jonctions serrées et empêcher les échanges sang-lait (Shennan and Peaker, 2000). La voie paracellulaire reprend à la fin de la lactation, lorsque l'activité sécrétoire s'est arrêtée.

1.2.3.2. Le réflexe d'éjection du lait

La décharge de lait est un mouvement involontaire commun à tous les mammifères et requiert la participation du système neuroendocrinien. Après un stimulus extérieur de la glande (le nouveau né qui tète, la traite manuelle, le lavage des glandes), l'hypophyse libère de l'**ocytocine** dans le système sanguin qui, une fois dans la glande, se fixe aux récepteurs présents sur les cellules myoépithéliales (Herve *et al.*, 2018). L'ocytocine provoque alors la contraction

des cellules myoépithéliales autour des CES et des petits conduits, diminuant le diamètre des conduits et augmentant celui de la lumière alvéolaire, facilitant l'écoulement du lait.

Lorsque la pression exercée sur la paroi épithéliale est trop élevée (30-40 mm Hg), le débit sanguin dans la glande est ralenti et les CES cessent de synthétiser le lait. Avec la pression, les MFG peinent à passer les membranes et s'accumulent dans les CES. C'est donc le lait pauvre en matière grasse qui est déversé en début de traite. A la fin de la traite, la pression redescend et les CES déversent le gras dans la lumière grâce à l'action de l'ocytocine (Herve *et al.*, 2018) ; ainsi le lait alvéolaire est plus riche en MG mais contient la même proportion de protéines. Avec la diminution de la pression, les précurseurs sanguins sont de nouveau disponibles et la synthèse du lait peut recommencer.

1.2.4. Volume de lait produit

La vitesse de production de lait est maximale immédiatement après la traite puis diminue quelques heures plus tard (Davis *et al.*, 1998). L'accumulation du lait ne semble pas être linéaire en fonction du temps (Whittem, 2012). En effet, la production de lait est plus importante lorsque la fréquence de traite est élevée (Davis, Farr and Stelwagen, 1999).

Après la traite, un certain volume de lait, appelé volume **résiduel**, reste dans la mamelle. Comme la citerne est totalement vidée après la traite, ce volume se trouve au niveau alvéolaire. Le volume résiduel varie entre les animaux et les espèces et est plus faible en fin de lactation. Par injection d'adrénaline après la traite, qui stoppe la production du lait, puis d'ocytocine, une seconde traite permet de récupérer ce volume résiduel (Knight, Hirst and Dewhurst, 1994; Davis *et al.*, 1998; Herve *et al.*, 2018). Le volume récupéré dépend de la dose d'ocytocine administrée et du temps entre la traite et l'administration. Pour les bovins, le volume résiduel a été déterminé expérimentalement comme étant de 5 à 14% du volume total de la glande (Whittem, 2012).

Au fur et à mesure que la lactation progresse, le volume de production du lait quotidien diminue. Le volume résiduel de lait diminue également (Knight, Hirst and Dewhurst, 1994).

1.3. Transporteurs de la glande mammaire

De récentes études ont mis en évidence le transport actif de certains composants du lait par des transporteurs appartenant aux sous-familles *ATP-binding cassette* (ABC) et *Solute Carrier*

(SLC) présents dans la glande mammaire (Montalbetti *et al.*, 2014; García-Lino *et al.*, 2019; Ventrella *et al.*, 2019).

1.3.1. Nature et expression des transporteurs

Suivant leur localisation au niveau de la membrane basale ou apicale des cellules, les transporteurs participent à l'absorption, la réabsorption ou l'efflux de nutriments ou de xénobiotiques (Virkel *et al.*, 2019). Ils constituent également un système de défense en participant à la détoxification et l'élimination des xénobiotiques de l'organisme tels que des médicaments, des pesticides et des polluants de l'environnement (Ito and Alcorn, 2003; Jonker *et al.*, 2005; Yagdiran *et al.*, 2016). Ces transporteurs peuvent aussi être le site d'interactions entre les nutriments et les xénobiotiques ou entre plusieurs xénobiotiques. Le polymorphisme de ces transporteurs peut influencer le transfert des nutriments et des xénobiotiques dans le lait et ainsi sa composition et sa qualité (García-Lino *et al.*, 2019).

Le niveau d'expression (quantité d'ARN) de la plupart des transporteurs de la glande mammaire en lactation est comparable à celle des reins, du foie ou du placenta (Alcorn *et al.*, 2002; Ito and Alcorn, 2003). Toutefois, l'expression de certains transporteurs de la glande mammaire peut varier (Alcorn *et al.*, 2002; Lindner *et al.*, 2013), probablement dû à l'influence des différentes hormones de la glande et à leur rôle physiologique dans la production du lait (Ito and Alcorn, 2003). Les principaux transporteurs de la glande mammaire sont présentés ci-dessous (voir Figure 4).

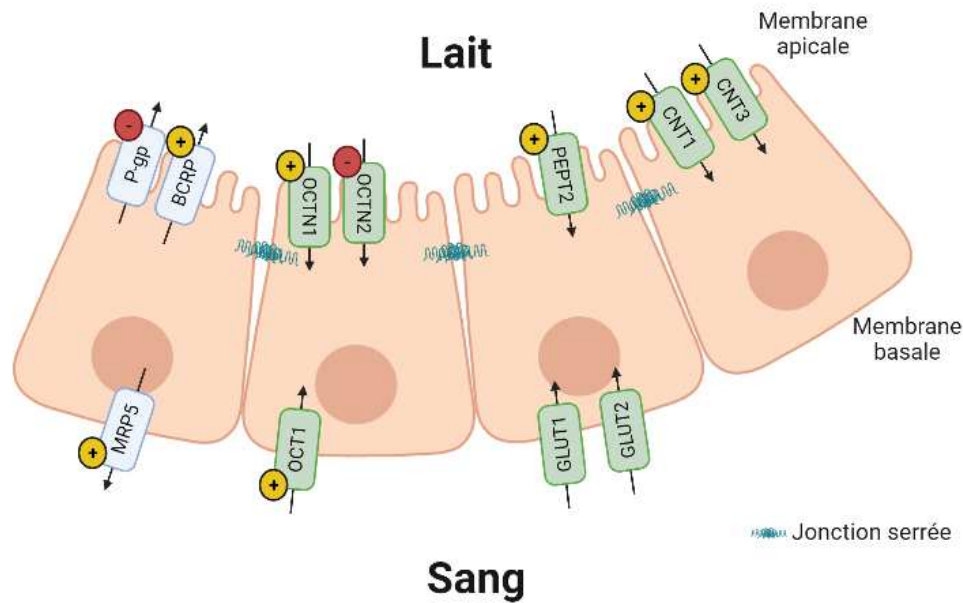


Figure 4: Représentation schématique des principaux transporteurs de la barrière sang-lait. Les transporteurs de la sous-famille ABC sont représentés en bleu et ceux de la sous-famille SLC en vert. Les symboles + et - représentent la sur-expression ou la sous-expression des transporteurs lors de la lactation, respectivement. Créé avec BioRender.com.

1.3.1.1. Transporteurs sur-exprimés pendant la lactation

Les transporteurs ABC ont pour rôle l'efflux de différentes substances telles que le cholestérol et autres lipides, les métabolites et les xénobiotiques grâce à l'hydrolyse d'ATP. Ils contribuent à la fonction des barrières biologiques (Schrickx and Fink-Gremmels, 2008).

La *Breast Cancer Resistance Protein* (**BCRP** ou ABCG2) est le transporteur majoritaire de la glande mammaire pendant la lactation (Mahnke *et al.*, 2016; Virkel *et al.*, 2019). Son importante expression a été observée chez la souris, la vache, la brebis et la chèvre, principalement au niveau **apical** des CES et dans la plupart des canaux (Lindner *et al.*, 2013). Grâce à l'action de la prolactine, l'expression de BCRP est induite à la fin de la gestation et pendant la lactation (Jonker *et al.*, 2005; Lindner *et al.*, 2013). La BCRP permet l'efflux dans le lait de vitamines, de stéroïdes, d'acides biliaires mais également d'antibiotiques (fluoroquinolones, pénicilline G) et autres xénobiotiques (Wassermann, Halwachs, Baumann, *et al.*, 2013; Mahnke *et al.*, 2016; García-Lino *et al.*, 2019). Elle est également impliquée dans la prolifération des cellules mammaires épithéliales par un mécanisme autocrine/paracrine

(Naylor *et al.*, 2003), ce qui explique la diminution rapide de son expression lors de l'involution. Son expression semble être conservée entre les espèces.

Les transporteurs SLC agissent comme des transporteurs facilitateurs passifs ou des transporteurs actifs secondaires lorsque le passage de deux substances est couplé. Ils peuvent transporter un large éventail de molécules.

L'*Organic Cation Transporters 1* (**OCT1** ou SCL22A1) est localisé au niveau **basal** des CES. Son expression augmente à partir du milieu de la lactation jusqu'à la fin (Alcorn *et al.*, 2002) (Ling and Alcorn, 2008; Gilchrist and Alcorn, 2010). Il est impliqué dans l'entrée dans les CES de la vitamine B1 (thiamine) et de molécules importantes pour la neurotransmission et la signalisation cellulaire (adrénaline, dopamine, sérotonine, acétylcholine).

L'expression de *Organic Cation Transporter Novel 1* (**OCTN1** ou SLC22A4) augmente au début de la lactation puis diminue, mais son rôle dans la glande reste à définir.

Le *pH-dependent proton/peptide cotransporteur 2* (**PEPT2** ou SLC15A2) est exprimé au niveau **apical** des CES. Son expression est augmentée par la prolactine pendant la lactation puis reste constante voir diminue avec la lactation (Gilchrist and Alcorn, 2010). Il a pour rôle de réabsorber de la lumière des alvéoles des peptides dérivés de l'hydrolyse des protéines du lait, qui serviront de source de précurseurs. PEPT2 permet aussi la réabsorption de xénobiotiques (métabolites des Beta lactam, antiviraux) et réduit ainsi leur charge dans le lait (Groneberg *et al.*, 2002).

L'*Organic Anion Transporteur Polypeptides* (**OATP2B1** ou SLCO2B1) est exprimé dans les CES et les cellules myoépithéliales de la glande et joue un rôle dans le transport du sodium et les anions organiques.

D'autres transporteurs tels que *Multi-drug Resistance-associated Protein 5* (MRP5 ou ABCC5), *Concentrative Nucleoside Transporters* (CNT ou SLC28A 1, 2 et 3) sont surexprimés pendant la lactation mais leur rôle dans la glande reste à définir (García-Lino *et al.*, 2019). Des transporteurs de vitamines et de sodium tels que SVCT (transport vitamine C) et RFVT (transport riboflavine) ont également été décrits avec des niveaux accrus pendant la lactation (Ventrella *et al.*, 2019).

1.3.1.2. Transporteurs sous-exprimés pendant la lactation

Au contraire, certains transporteurs habituellement présents dans la glande mammaire sont sous-exprimés pendant la lactation.

La glycoprotéine P (**P-gp**, MDR1 ou ABCB1), localisée au niveau **apical** dans de nombreux organes, a un rôle important dans le processus de détoxification. Dans la glande mammaire, son expression diminue drastiquement pendant la lactation (Alcorn *et al.*, 2002; Gilchrist and Alcorn, 2010). Cette sous-expression pourrait être expliquée par une réponse protectrice pour diminuer le passage de composés toxiques dans le lait.

L'expression de *Organic Cation / carnitine Transporter 2* (**OCTN2** ou SLC22A5) diminue également au cours de la lactation en fonction du stade de lactation, du transport de L-carnitine et de son besoin par le nouveau-né (Ito and Alcorn, 2003; Gilchrist and Alcorn, 2010).

1.3.2. Facteurs influençant l'expression des transporteurs

Des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN, microARNs, etc) peuvent faire varier l'expression des transporteurs de la glande. Les infections et inflammations peuvent également affecter l'expression des transporteurs. Par exemple, des études ont montré qu'une mammite à *S. aureus* entraînait la diminution de l'expression de BCRP dans la glande (Oskarsson *et al.*, 2017). Le stade de lactation influence également l'expression des transporteurs (Gilchrist and Alcorn, 2010).

L'implication précise de ces transporteurs est cependant à relativiser car certains résultats portent uniquement sur l'expression d'ARN des gènes codant pour les transporteurs, ce qui ne reflète pas nécessairement l'expression des protéines ou leurs fonctionnalités.

1.4. Modèles d'étude du passage des xénobiotiques dans le lait

1.4.1. Influence des propriétés physico-chimiques des xénobiotiques

La **voie d'administration** des xénobiotiques influence leur absorption, leur distribution et leur passage dans le lait. Par exemple, les xénobiotiques administrés par voie parentérale sont absorbés plus facilement et rapidement que par voie orale. D'un autre côté, les xénobiotiques administrés par voie percutanée peuvent être stockés par la couche supérieure de l'épiderme (couche cornée) et sont libérés progressivement dans le lait (Hodošček *et al.*, 2008). Par ailleurs,

les xénobiotiques administrés par voie intra-mammaire (IMM) doivent être administrés de préférence après la traite pour éviter leur dilution dans le lait présent dans la glande (Gehring and Smith, 2006).

La **formulation** joue également un rôle important dans l'absorption et la distribution dans le tissu, particulièrement pour les xénobiotiques administrés par voie IMM (Gehring and Smith, 2006). Par exemple, la distribution de pénicilline dans la glande est accrue après administration IMM d'une suspension à base huile contenant des petites particules ($< 10 \mu\text{m}$ de diamètre), comparé à une formulation aqueuse et à une suspension à base huile contenant des macroparticules ($\sim 40 \mu\text{m}$ de diamètre) (Ehinger and Kietzmann, 2000a). Une formulation d'oxacilline contenant du dodécylsulfate de sodium a entraîné des concentrations d'oxacilline dans la glande beaucoup plus faibles que la formulation dépourvue de cet excipient. Celui-ci semble provoquer une irritation des trayons qui limite la distribution du principe actif (Ehinger and Kietzmann, 2000b).

La **fixation** des xénobiotiques aux lipides ou protéines du lait favorise leur élimination car les molécules restent piégées dans le lait. Par exemple, la norfloxacin (fluoroquinolone) est fixée à 50% aux protéines du lait (tandis qu'elle est fixée à 10-15% aux protéines plasmatiques) et sa concentration dans le lait est bien supérieure à celle dans le plasma (Gips and Soback, 1999). Par ailleurs, une forte fixation aux protéines tissulaires de la glande peut prolonger la persistance des résidus dans le lait (Gehring and Smith, 2006). A l'inverse, une forte fixation aux protéines plasmatiques empêche les xénobiotiques de se distribuer dans la glande et le lait. Lors d'une inflammation de la mamelle, certaines protéines comme l'albumine augmentent dans le lait et peuvent influencer l'excrétion des xénobiotiques.

Le **taux d'ionisation** du xénobiotique dépend de son pK_a et du pH du milieu. Un xénobiotique faiblement ionisé passe mieux les membranes physiologiques et se distribue davantage dans les tissus. Pour un acide faible, la proportion non-ionisée augmente lorsque le pH du milieu devient plus acide, tandis que pour une base faible, la proportion non ionisée augmente lorsque le pH du milieu devient plus alcalin (Gehring and Smith, 2006). Le pH du lait ($\sim 6,7$) étant légèrement plus acide que le pH du plasma ($\sim 7,4$), les bases faibles s'accumulent davantage dans le lait que les acides faibles, par un phénomène qu'on appelle « *ion trapping* » (Ozdemir, 2018) (voir Figure 5). Par exemple, le sulfacétamide a un faible pK_a basique (5,4) et s'accumule faiblement dans le lait (ratio lait/plasma à 0,08, voir section 1.4.2) ; à l'inverse la sulfanilamidine a un pK_a basique élevé (10,4) donc est plus ionisée et s'accumule

d'avantage dans le lait (ratio lait/plasma à 1) (Sisodia and Stowe, 1964; Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2002).

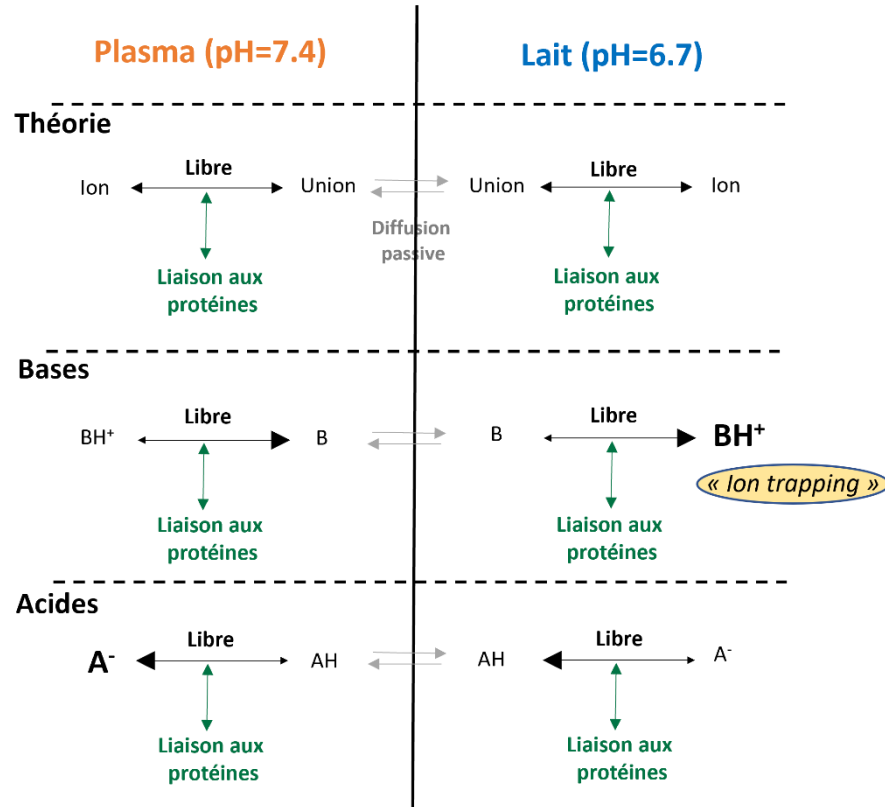


Figure 5: Représentation schématique de la distribution d'un xénobiotique (panneau supérieur), d'une base (panneau du milieu) et d'un acide (panneau inférieur) entre le plasma et le lait. Le terme Union représente les molécules sous forme non ionisée. Les termes en gras représentent les formes majoritaires en fonction du pH du milieu.

Le caractère **lipophile** et le faible poids moléculaire (PM) d'un xénobiotique facilitent également son passage à travers les membranes vers le lait et sa distribution dans la mamelle (organe riche en lipides) (Ozdemir, 2018), ou de son absorption dans la circulation systémique en cas d'administration IMM (Gehring and Smith, 2006). L'éthanol, par exemple, a un faible PM (46 Da) et atteint des concentrations élevées dans le lait, tandis que l'héparine (30000 Da) et l'insuline (6000 Da), de PM élevés, ne sont pas retrouvées dans le lait (Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2002). En ce qui concerne la lipophilie, une étude a montré que la danofloxacin (fluoroquinolone) s'accumule davantage dans le lait de brebis (plus gras) que celui de chèvre pour la même dose administrée (Shem-Tov *et al.*, 1997, 1998).

Des interactions peuvent survenir au niveau des **transporteurs** entre les xénobiotiques et entre les xénobiotiques et les nutriments. Par exemple, l'inhibition de la BCRP par l'ivermectine a réduit de près de 40% la concentration de la danofloxacin, substrat de la BCRP, dans le lait mais n'a pas eu d'effet significatif sur sa concentration dans le plasma (Real *et al.*, 2011).

1.4.2. Ratio M/P

Le passage de xénobiotiques dans le lait dépend de divers mécanismes tels que la diffusion passive, le transport actif mais également la pinocytose et l'exocytose. La capacité de passage des xénobiotiques dans le lait peut être caractérisée par le rapport des concentrations lactiques et plasmatiques à l'équilibre (aussi dénommé ratio **M/P**). Ce ratio peut également être calculé par le rapport de l'aire sous la courbe (AUC pour *area under the curve*) des concentrations lactiques et plasmatiques. Lorsque peu de données sont disponibles, le rapport des concentrations dans le lait et le plasma aux moments d'échantillonnage peut aussi être utilisé pour calculer le ratio M/P (Ozdemir *et al.*, 2018). Cependant, le meilleur calcul reste celui du rapport des AUC (Fleishaker, 2003).

La valeur de ce ratio M/P dépend de la composition du lait (voir section 1.2.1) et des propriétés physico-chimiques du xénobiotique (voir section 1.4.1). En fonction de la méthode de calcul utilisée, elle n'est pas constante en fonction du temps et dépend de la voie et du nombre d'administration du xénobiotique ainsi que de sa demi-vie d'élimination. Les xénobiotiques ayant un ratio M/P supérieur à 1 sont considérés comme activement sécrétés dans le lait (Fatemi and Ghorbanzad'e, 2010).

Le ratio M/P peut être utilisé pour calculer la concentration d'un xénobiotique dans le lait à partir de ses concentrations plasmatiques ($C_{\text{milk}} = M/P \times C_{\text{plasma}}$) (Anderson and Sauberman, 2016). Cependant il faut faire preuve de prudence avec ce paramètre et les conditions dans lesquelles il a été mesuré (rapport des AUC, rapport des concentrations lors d'échantillonnage, etc). De nombreux modèles non cliniques (*in vitro*, *in vivo* chez l'animal, *in silico*) ont été développés pour prédire ce ratio M/P (voir section 1.4.3).

1.4.3. Modèles non clinique d'étude du passage de xénobiotiques dans le lait

Plusieurs modèles *in vitro*, *in vivo* et *in silico* non-clinique sont disponibles et peuvent être utilisés pour mimer la physiologie de la glande ou prédire l'excrétion des xénobiotiques dans le lait (Ventrella *et al.*, 2019; Nauwelaerts *et al.*, 2021).

1.4.3.1. Modèles *in vitro*

❖ Modèles de membrane artificielle

Pour explorer la diffusion passive des xénobiotiques à travers une bicouche phospholipidique telle que la barrière sang-lait, il est possible d'utiliser un modèle de membrane artificielle.

Le modèle de perméabilité à membrane artificielle parallèle (PAMPA pour *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) est composé d'une plaque filtrante de 96 puits recouverte d'une membrane lipidique (tricouche de lipide- huile- lipide) « receveuse » et d'une plaque correspondante « donneuse » (Chen *et al.*, 2008) (voir Figure 6). Une solution contenant le xénobiotique est ajoutée dans les puits de la plaque donneuse et une solution tampon dans ceux de la plaque receveuse. Les deux plaques sont ensuite assemblées et incubées à température ambiante pendant plusieurs heures. A la fin de l'incubation, la solution présente dans chacune des plaques est analysée pour déterminer la concentration du xénobiotique. Une perméabilité (Papp en cm/s) peut alors être calculée (Eq.1).

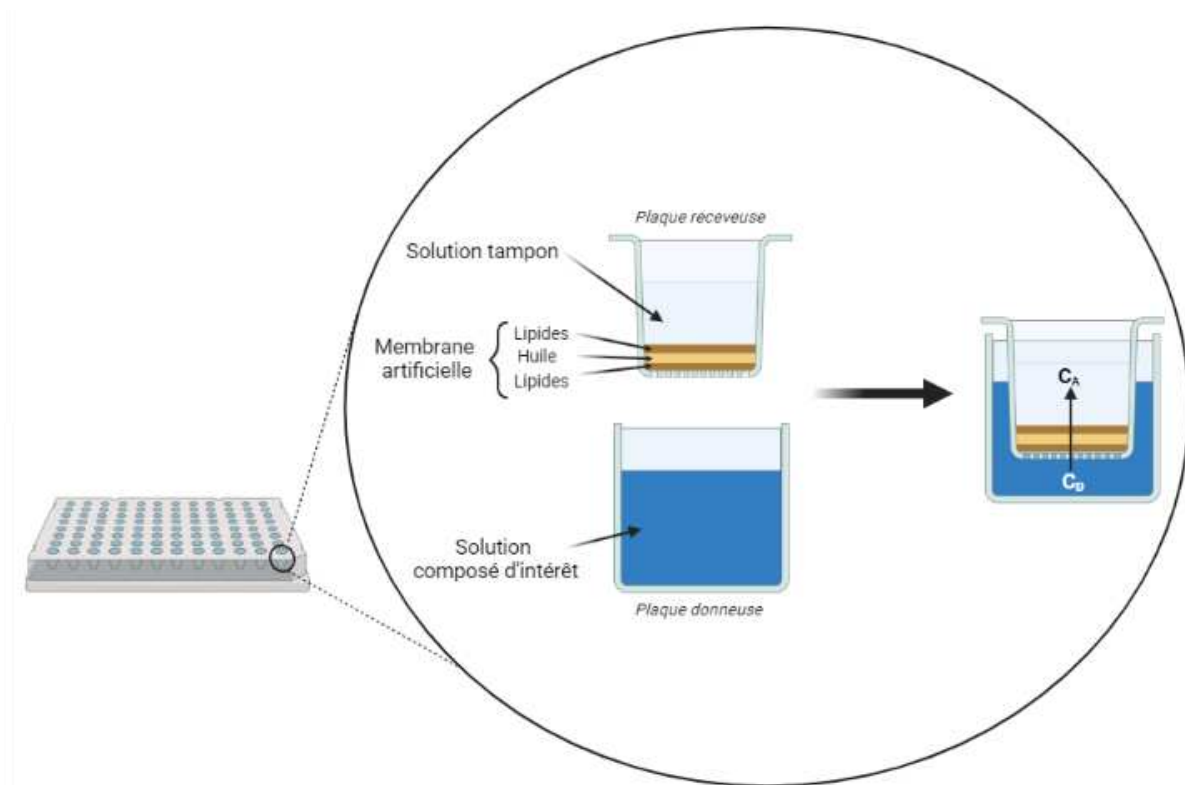


Figure 6: Représentation schématique du modèle *in vitro* de membrane artificielle PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*).
Crée sur BioRender.com.

$$P_{app} = \frac{-\ln\left(\frac{1-C_A(t)}{C_{eq}}\right)}{A \times \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) \times t} \quad (1)$$

$$\text{avec } C_{eq} = \frac{C_D(t) \times V_D + C_A(t) \times V_A}{V_D + V_A}$$

où A est la surface du filtre, V_D est le volume du compartiment/puit donneur, V_A est le volume du compartiment/puit receveur, t est le temps d'incubation (secondes), $C_A(t)$ est la concentration du composé dans le puit receveur au temps t , $C_D(t)$ est la concentration du composé dans le puit donneur au temps t .

Avec ce type de membrane, on considère que les xénobiotiques ayant une P_{app} inférieure à 10^{-6} cm/s ont une faible perméabilité (Chen *et al.*, 2008).

❖ Modèles cellulaires

Les modèles cellulaires sont basés sur l'hypothèse que l'épithélium mammaire est la barrière principale entre le sang et le lait. Différentes cultures de cellules épithéliales humaines

et animales (cellules primaires ou lignées cellulaires) sont utilisées pour étudier la diffusion passive et le transport actif des xénobiotiques dans le lait. Les principaux modèles *in vitro* humains et animaux sont présentés ci-dessous.

Parmi les modèles humains, les cellules épithéliales mammaires humaines primaires (**HMEC** pour *Human Mammary Epithelial Cells*) sont principalement utilisées pour étudier le transport transépithélial. Ce sont des cellules différenciées au stade de lactation par ajout de prolactine (ARNm de β -caséine détecté) (Kimura *et al.*, 2006). Des études ont montré qu'elles expriment les transporteurs actifs OCT1 et OCT3 mais de plus amples investigations sont nécessaires afin de déterminer si elles expriment aussi la BCRP et si elles représentent un bon modèle d'étude du passage dans le lait.

Le principal modèle rongeur utilisé correspond aux cellules épithéliales mammaires murines **HC11**. Ces lignées cellulaires immortalisées sont dérivées de cellules primaires COMMA-1D obtenues à partir du tissu mammaire de souris Balb/c en stade de gestation (Ball *et al.*, 1988). Elles sont également différenciées en un phénotype producteur de caséine par l'utilisation de prolactine (Andersson *et al.*, 2013) et utilisées pour étudier la prolifération, la transduction du signal et la différenciation des cellules épithéliales mammaires. Elles expriment également différents transporteurs (BCRP, MDR1, MRP1, OCT1, OCTN1) (Yagdiran *et al.*, 2016).

Parmi les modèles animaux non rongeurs, les cellules rénales canines Madin-Darby (**MDCKII** pour *Madin-Darby Canine Kidney*) ont été transfectées avec la BCRP clonée à partir de tissus mammaires en lactation de bovins, d'ovins et de caprins (Wassermann, Halwachs, Lindner, *et al.*, 2013). Elles sont utilisées pour étudier le transport des substrats de la BCRP. Les cellules immortalisées épithéliales mammaires bovines (**BME-UV** pour *Bovine Mammary Epithelial cells*) proviennent, elles, de cellules primaires issues de la glande d'une vache laitière de race Holstein. Certaines études montrent que ces cellules bovines expriment des transporteurs OAT et OCT (Al-Bataineh *et al.*, 2009; Al-Bataineh *et al.*, 2012) tandis que d'autres montrent qu'elles n'expriment que MRP1 et MDR1 (pourtant sous exprimés pendant la lactation) (Yagdiran *et al.*, 2016). Les cellules primaires épithéliales mammaires caprines (**pgMECs** pour *primary goat Mammary Epithelial Cells*) sont dérivées du tissu mammaire de jeunes chèvres en lactation (ou non) et possèdent un phénotype de lactation. Elles peuvent être utilisées pour étudier le développement mammaire, la biologie de la lactation et l'immunité de la glande mammaire (Ogorevc and Zorc, 2018).

Il existe également des modèles de dialyse à l'équilibre ou de diffusion, utilisés pour mesurer les ratio M/P (Fleishaker, 2003). Dans l'ensemble, ces modèles *in vitro* permettent d'étudier le transfert de xénobiotiques dans le lait. Combinés avec des modèles animaux *in vivo* ils peuvent également être utilisés dans des extrapolations *in vitro to in vivo* (IVIVE) et intégrés dans le développement de modèles mécanistiques *in silico*.

1.4.3.2. Modèles *ex vivo*

Plusieurs modèles *ex-vivo* ont été utilisés pour étudier les transporteurs de la glande (Ventrella *et al.*, 2019). Depuis les explants de tissus de rongeurs contenant des alvéoles jusqu'à l'utilisation des glandes mammaires perfusées (viables jusqu'à 6 h après l'abattage) comme modèle d'absorption percutanée, ces quelques modèles sont utilisés pour modéliser la biologie de la glande mammaire animale (Kietzmann *et al.*, 1993; Pinto *et al.*, 2017).

Ces modèles présentent quelques avantages sur les modèles *in vitro*. Ils permettent l'étude de l'expression des gènes mais également de la réponse du système immunitaire après infection, et du métabolisme. Par exemple, les membranes des MFG sont enrichies en xanthine oxydoréductase (XOR), une enzyme à large spécificité de substrat capable de métaboliser certains xénobiotiques (Pritsos, 2000). De plus, ces modèles *ex-vivo* utilisent des glandes collectées dans les abattoirs et réduisent l'utilisation de modèles animaux vivants.

1.4.3.3. Modèles *in vivo*

Les rongeurs, habituellement privilégiés dans la recherche biomédicale, produisent de faibles volumes de lait ce qui limite les possibilités d'échantillonnage et de dosage. Ils sont peu utilisés dans les études sur la barrière sang-lait (McNamara, Burgio and Yoo, 1992; Ling and Alcorn, 2008). Néanmoins, ils sont souvent utilisés pour étudier les mécanismes du cancer du sein et de nombreuses informations concernant leurs glandes mammaires sont disponibles (Ventrella *et al.*, 2019).

Les truies possèdent de grandes similarités anatomiques et physiologiques (présence de transporteurs similaires à l'homme) avec les humains, elles sont très utilisées en médecine translationnelle (Gutierrez *et al.*, 2015; Roura *et al.*, 2016) et peuvent être de bons modèles pour étudier le rôle des transporteurs de la glande mammaire. Les mini-cochons (ex : Yucattan ou Goettingen), plus simples à manipuler, sont également de plus en plus utilisés en toxicologie et

pharmacologie, cependant les données concernant la composition de leur lait sont encore manquantes (van der Laan *et al.*, 2010).

Les ruminants (principalement bovin, ovin) sont évidemment très utilisés pour l'étude de transfert de xénobiotiques dans le lait pour leur rôle dans la production de denrées alimentaires d'origine animale (Lindner *et al.*, 2013; Mahnke *et al.*, 2016; Bianca *et al.*, 2017; Virkel *et al.*, 2019).

Même si le processus de lactation est très variable entre les espèces animales, ces modèles animaux *in vivo* permettent d'explorer des mécanismes de la barrière sang-lait, l'évaluation de certains paramètres (composition et volume du lait, interactions) sur l'excrétion lactée des xénobiotiques et l'évaluation des effets des résidus de xénobiotiques dans le lait sur les nouveau-nés (Nauwelaerts *et al.*, 2021).

1.4.3.4. Modèles *in silico*

Les modèles empiriques décrivent la relation entre les données d'entrée (xénobiotique, dose, voie d'administration) et les données de sortie (caractéristiques d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion -ADME-, ratio M/P). Les modèles semi-mécanistiques, eux, prennent en compte les principaux processus physiologiques (ou les plus pertinents). Les principaux modèles empiriques et semi-mécanistiques décrivant le ratio M/P sont présentés ci-dessous (Fleishaker, 2003).

❖ Modèles empiriques basés sur les propriétés physico-chimiques

Rasmussen (1971) rapporte que ce sont les différences de pH entre le plasma (pH_p) et le lait (pH_{milk}) qui gouvernent le transfert de xénobiotiques dans le lait et que seule une molécule libre et non-ionisée peut diffuser passivement dans le lait (Rasmussen, 1971). Basé sur cette théorie, il a prédit le ratio de concentration libre dans le lait et libre dans le plasma (M_u/P_u) à partir de l'équation de Henderson-Hasselbach, du pH du lait et du plasma et du pKa du xénobiotique (Eq.2, 3). Le ratio est inférieur à 1 pour les xénobiotiques acides, égal à 1 pour les neutres et supérieur à 1 pour les bases. Cependant Rasmussen ne prend pas en compte la fixation (plasmatique et laitière) et décrit uniquement la diffusion passive dans le lait des molécules libres et non-ionisées.

$$M_u/P_u = \frac{1 + 10^{(pH_{milk} - pKa)}}{1 + 10^{(pH_p - pKa)}} \text{ pour les acides} \quad (2)$$

$$M_u/P_u = \frac{1 + 10^{(pKa-pH_{milk})}}{1 + 10^{(pKa-pH_p)}} \text{ pour les bases} \quad (3)$$

Atkinson (1988) prend en compte la fixation aux protéines et aux lipides et décrit un ratio de concentration dans le lait écrémé et le plasma (M_{skim}/P) en prenant en compte la fraction libre dans le plasma (fu_p) et dans le lait écrémé ($fu_{skim,milk}$, calculé à partir de fu_p), considérant ainsi la fixation aux protéines plasmatiques et aux lipides du lait (Eq. 4,5) (Atkinson and Begg, 1988).

$$M_{skim}/P = (M_u/P_u) \times \frac{fu_p}{fu_{skim,milk}} \quad (4)$$

$$fu_{skim,milk} = \frac{fu_p^{0,448}}{(6,94 \times 10^{-4})^{0,448} + fu_p^{0,448}} \quad (5)$$

Atkinson (1990) améliore cette relation par la suite et la réadapte au lait entier pour les acides (Eq.6) et les bases (Eq.7). Il considère les volumes des phases aqueuse (0,955 pour l'homme) et lipidique (0,045 pour l'homme) du lait et le coefficient de partition aux lipides ($k_{lipides}$), calculé à partir du coefficient de partition octanol-eau à pH 7,2 ($\log D_{7,2}$) (Eq.8, 9) (Atkinson and Begg, 1990). La transformation de l'équation en logarithme permet de tenir compte de la pondération inégale des différents facteurs.

$$\log(M/P) = -0,405 + 9,36 \times \log(M_u/P_u) - 0,69 \times \log fu_p - 1,54 \times \log A \quad (6)$$

$$\log(M/P) = 0,02477 + 2,28 \times \log(M_u/P_u) + 0,886 \times \log fu_p + 0,505 \times \log A \quad (7)$$

avec

$$A = \frac{0,955}{fu_{skim,milk}} + 0,045 \times k_{lipides} \quad (8)$$

$$\log k_{lipides} = 1,29 \times \log D_{7,2} - 0,88 \quad (9)$$

Meskin (1985) ajoute un facteur pouvant affecter le passage des molécules : le PM. Il utilise également le coefficient de partage octanol-eau ($\log P$) pour les acides et le rapport entre la forme non-ionisée (non dissociée) et ionisée (dissociée) ($\log U/I$) pour les bases (Meskin and Lien, 1985). Les résultats montrent une corrélation négative entre le **log(M/P)** et la racine du PM et le $\log P$ pour les acides ($R^2=0,807$) (Eq. 10) ; entre le **log(M/P)** et le $\log P$ et le $\log D$ pour les bases ($R^2=0,801$) (Eq.11). D'après ces résultats, une haute lipophilie du xénobiotique ($\log P$ élevé) pourrait favoriser la fixation aux protéines plasmatiques (par des interactions

hydrophobes non spécifiques) et diminuer la quantité de xénobiotique qui diffuse dans le lait (faible $\log M/P$). En effet, des études ont montré que l'adsorption de phénols sur l'albumine sérique bovine, et de pénicillines sur l'albumine sérique humaine étaient positivement corrélées avec leur $\log P$ (Kiehs, Hansch and Moore, 1966; Bird and Marshall, 1967). Pour les bases, plus la molécule est sous forme non-ionisée dans le plasma ($\log U/I$ faible), plus elle passera dans le lait, où elle sera ionisée à cause du pH plus acide du lait et piégée ($\log M/P$ élevé). Pour les acides, l'étude suggère que plus la molécule est large ($\sqrt{PM}$ élevé), moins elle diffusera dans le lait ($\log M/P$ faible) (Meskin and Lien, 1985).

$$\log (M/P) = 2,068 - 0,162 \times \sqrt{PM} - 0,185 \times \log P \quad (10)$$

$$\log (M/P) = 0,265 - 0,153 \times \log P - 0,128 \times \log(U/I) \quad (11)$$

Agatonovic Kustrin (2002) a ensuite développé ce modèle avec l'utilisation d'un réseau neuronal artificiel (programme informatique d'inspiration biologique). Son modèle QSPR (pour *quantitative structure-property relationship*) ou QSAR consiste à mettre en évidence une relation quantitative entre une grandeur macroscopique, ici le ratio M/P, et la structure moléculaire des xénobiotiques étudiés. Ce modèle a identifié 9 meilleurs descripteurs du transfert de molécules dans le lait parmi les propriétés structurelles chimiques et physiques basiques d'une molécule. Ainsi, la taille, la forme et les propriétés électroniques de la molécule sont les facteurs les plus influents sur le ratio M/P (Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2002). Ce genre de modèle permet de s'affranchir de données expérimentales et de prédire le rapport M/P de xénobiotiques uniquement à partir de leur structure.

Par la suite, plusieurs modèles QSPR ont été développés pour prédire le ratio M/P en fonction de descripteurs moléculaires (Katritzky *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Abraham, Gil-Lostes and Fatemi, 2009). **Anderson** (2016) conclut que ces modèles QSPR contribueront aux stratégies futures permettant de prédire le transport à travers les CES, notamment grâce à leur intégration dans des modèles mécanistes de la disposition des médicaments au niveau cellulaire (Anderson, 2006).

Bien que la performance prédictive de ces modèles soit assez robuste pour de nombreuses molécules, ils ne permettent pas de comprendre les modifications des facteurs qui influent sur le rapport M/P et donc sur le passage de la barrière sang-lait. Comme dit précédemment (voir

section 1.4.2), le paramètre M/P est extrêmement dépendant de la pharmacocinétique plasmatique du xénobiotique et peut varier en fonction du temps en fonction de la méthode de calcul. Pour être utile, ce paramètre doit refléter le rapport des AUC dans le lait et le plasma, en particulier pour les molécules avec une faible demi-vie plasmatique (Ventrella *et al.*, 2019). De plus, aucun de ces modèles ne prend en compte le **transport actif** impliqué dans le passage de certaines molécules (dont le ratio M/P observé est bien supérieur à celui estimé) (Fleishaker, 2003).

❖ Modèles empiriques basés sur des données observées longitudinales

Koshimichi (2011) développe un modèle **empirique** plus complexe pour prédire le transfert dans le lait. Au contraire des précédents modèles, il fait l'hypothèse qu'il n'y a pas toujours un équilibre instantané entre le plasma et le lait. Dans son modèle, il prend en compte la sécrétion des xénobiotiques dans le lait (CL_{sec}) et leur réabsorption dans le plasma (CL_{reab}), considérant ainsi la perméabilité limitée et le transport actif des xénobiotiques. Contrairement aux modèles précédents, ce modèle a besoin de données observées longitudinales (concentrations libres dans le plasma et le lait en fonction du temps) pour estimer ces deux paramètres et prédire le profil pharmacocinétique des xénobiotiques dans le plasma et le lait. Les résultats de l'étude montrent que lorsque les données observées ne sont pas disponibles pour certaines molécules utilisant la diffusion passive, les logarithmes des paramètres CL_{sec} (Eq.12, $R^2=0,705$) et CL_{reab} (Eq.13, $R^2=0,472$) peuvent être prédites à partir de paramètres physicochimiques dont la surface polaire (PSA pour *polar surface area*) et le donneur de liaison hydrogène (HBD pour *hydrogen bond donor*). Le modèle permet également de prédire un ratio M/P basé sur les AUC (Eq.14), calculé grâce à une fraction libre dans le lait entier à partir des calculs de **Atkinson** (1990) (Atkinson and Begg, 1990) (Eq. 15).

$$\log(CL_{sec}) = -3,912 - 0,015 \times PSA + 3,367 \times \log(PM) - 0,164 \times \log \frac{P}{D_{7,2}} \quad (12)$$

$$\log(CL_{re}) = 2,793 + 0,179 \times \log P - 0,132 \times HBD \quad (13)$$

$$M/P (AUC) = \frac{AUC_{milk}}{AUC_{plasma}} = \frac{CL_{sec}}{CL_{re}} \times \frac{fu_p}{fu_{whole,milk}} \quad (14)$$

$$fu_{whole,milk} = \frac{1}{A} \quad (15)$$

Avec A présenté Eq. 8.

Comparé aux autres modèles *in silico*, ce modèle a pour avantage de distinguer les molécules qui diffusent passivement de celles qui sont substrats de transporteurs actifs. C'est un modèle dynamique qui prend en compte le profil cinétique de la molécule dans le plasma et le lait et permet de calculer un ratio M/P basé sur les AUC. Cependant il ne considère pas la variation du **volume de lait**, un paramètre dynamique qui ne peut être fixé, ni les **changements temporels et événementiels** de la composition (protéines, MG) et des propriétés (pH) du lait.

Par la suite, des modèles pharmacocinétiques compartimentaux avec une approche de population ont également été développés pour prédire l'excrétion de xénobiotiques dans le lait (Salman *et al.*, 2011; Tanoshima *et al.*, 2014). Ces modèles présentent l'avantage d'utiliser des données observées pour construire un modèle mathématique qui permet de simuler différentes situations (variation des doses ou de la voie d'administration) et d'étudier la variabilité du passage dans le lait (et les covariables impliquées). Cependant ces modèles ne sont ni basés sur la physiologie de la glande mammaire, ni sur le processus de sécrétion du lait et ne sont applicables qu'aux molécules étudiées.

❖ Modèles mécanistiques basés sur la physiologie

Les modèles mécanistiques (**PBPK**) s'appuient, au contraire des précédents, sur les processus physiologiques ainsi que sur les processus ADME des xénobiotiques. Ils sont décrits dans le chapitre 2.

2. La modélisation basée sur la physiologie (PBPK)

2.1. Principe de la modélisation PBPK

Les modèles PBPK ont fait leur apparition il y a un siècle. Le premier modèle, décrit par Teorell en 1937, explore les différentes voies d'administration extravasculaires. Il se base sur la physiologie des organismes pour évaluer la cinétique des xénobiotiques et représente la circulation sanguine en contact avec les tissus du corps (Paalzow, 1995).

Cependant, ces modèles nécessitent beaucoup de données expérimentales, pour la physiologie des espèces étudiées ainsi que pour les caractéristiques physico-chimiques des médicaments, qui sont alors difficilement accessibles. De plus, ils présentent des équations mathématiques parfois complexes, difficiles à résoudre. Ils sont donc laissés de côté aux profits des modèles empiriques (Jones, Gardner and Watson, 2009).

C'est aux alentours des années 2000, quand de plus en plus de données expérimentales sont référencées, que la communauté scientifique se tourne à nouveau vers les modèles PBPK. Des outils d'extrapolation IVIVE et des modèles *in silico* permettant l'estimation de paramètres (physiologiques ou physico-chimiques) sans recours à des données expérimentales *in vivo* facilitent également leur utilisation (Poulin and Theil, 2002; Berezhkovskiy, 2004; Rodgers, Leahy and Rowland, 2005; Rodgers and Rowland, 2006). L'apparition, quelques années plus tard, de logiciels commerciaux pour l'application des modèles PBPK a également accéléré le développement des modèles.

Les modèles PBPK sont basés sur les processus physiologiques et biologiques. Leur intérêt majeur est la possibilité de prédire la distribution de xénobiotiques au sein des différents tissus d'un organisme. Ils permettent d'évaluer les effets du changement de paramètres physiologiques ou pharmacologiques, par exemple lors d'une pathologie, sur les concentrations tissulaires. De plus, ils permettent d'intégrer les différents mécanismes ADME d'une variété de xénobiotiques et d'incorporer des paramètres clefs issus de différentes sources (*in vitro*, *in vivo*, IVIVE, QSAR) pour comprendre le comportement pharmacocinétique d'une molécule (Bois, Jamei and Clewell, 2010). Enfin, ils constituent un outil particulièrement intéressant pour les extrapolations entre les espèces, les molécules et les schémas posologiques (voies d'administration et doses).

2.2. Construction d'un modèle PBPK

Plusieurs étapes sont nécessaires pour construire un modèle PBPK (Lin *et al.*, 2016) (voir Figure 7). Tout d'abord la recherche bibliographique et la définition de la structure du modèle, puis l'expression mathématique, l'implémentation dans un logiciel et la paramétrisation du modèle. Ensuite, le modèle est calibré, évalué grâce à des simulations et validé avant de pouvoir être appliqué. La validation peut être réalisée en suivant les critères en vigueur dans la réglementation (WHO, 2010). Ces principales étapes sont détaillées ci-dessous.

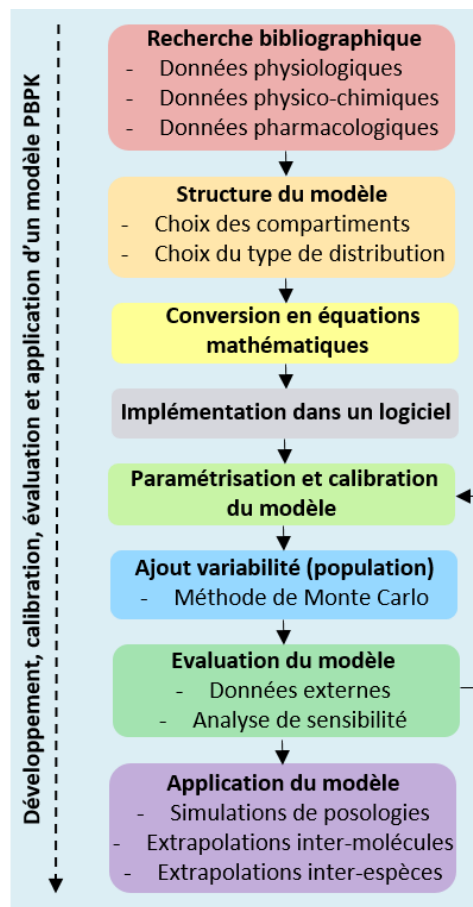


Figure 7: Organigramme pour le développement, la calibration, l'évaluation et l'application d'un modèle PBPK. Adapté de (Lin *et al.*, 2016).

2.2.1. Structure du modèle

❖ Structure générale/diagramme du modèle

La structure d'un modèle PBPK et son niveau de détail dépendent de son utilisation et des données disponibles. Globalement, le modèle est constitué de plusieurs compartiments, correspondant aux tissus, aux organes et aux fluides de l'organisme entier (par exemple le tissu adipeux, le foie, la bile), reliés entre eux par la circulation sanguine (artérielle et veineuse). Chaque compartiment est caractérisé par un volume et un débit sanguin, spécifiques de l'espèce étudiée.

Les compartiments choisis pour construire le modèle sont ceux impliqués dans l'ADME de la molécule, et les processus physio-pathologiques qui y sont liés (organe siège d'un effet toxique, tissu cible dans l'étude des résidus en médecine vétérinaire). Le modèle peut soit décrire l'ensemble des tissus de l'organisme (avec plus ou moins de détails), il est alors appelé « *whole body PBPK model* » (Nestorov, 2007) (voir Figure 8), soit décrire seulement les tissus d'intérêt pour l'application du modèle, il est appelé « *minimal PBPK model* ».

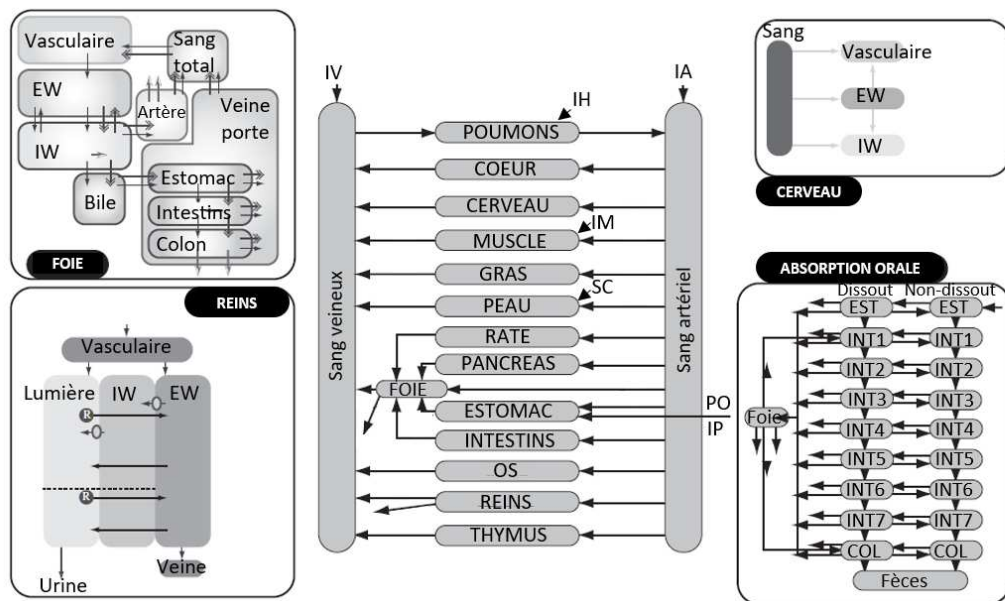


Figure 8: Exemple de modèle PBPK complet.

Pour les abréviations : EW : eau extracellulaire, IW : eau intracellulaire, IV : intraveineuse, IA : intraartérielle, IM : intramusculaire, IP : intrapéritonéale, IH : inhalation, SC : sous-cutané, PO : voie orale, EST : estomac, INT : intestins, COL : côlon.

Adapté de (Peters, 2012).

Dans le *whole PBPK*, la plupart des tissus sont connectés en parallèle, conformément à la physiologie. Les poumons sont connectés en série aux autres tissus. Plutôt que de considérer un organe comme étant un compartiment homogène, on peut chercher à décrire différents phénomènes pharmacocinétiques (PK) au sein de cet organe en le décomposant en plusieurs sous-compartiments. C'est le cas par exemple pour le tractus gastro-intestinal (TGI), le foie, les reins ou le cerveau (voir Figure 8). En détaillant de multiples organes, ce genre de modèle permet de simuler différentes voies d'administration : par exemple le TGI pour une voie *per os*, les poumons pour une inhalation, la peau pour une voie sous-cutanée.

Le *minimal PBPK* représente généralement les intestins, le foie et les reins pour la médecine humaine ; ainsi que les tissus d'intérêt pour les denrées d'origine animale (par exemple les muscles, le gras) pour la médecine vétérinaire (Lin *et al.*, 2016). Il contient également un compartiment groupé (lumping) où plusieurs tissus sont représentés par un seul système cinétique (Bois, Jamei and Clewell, 2010). Cela permet par exemple de séparer en deux groupes les tissus richement perfusés (le cerveau, les poumons) et les tissus pauvrement perfusés (le pancréas, la rate). La nature du regroupement est propre à la molécule utilisée et doit prendre en compte les propriétés pharmacologiques (Upton, Foster and Abuhelwa, 2016). Cette approche permet de simplifier le modèle et de diminuer le nombre de paramètres à renseigner (voir section 2.2.3) lorsque ceux-ci sont difficilement disponibles ou de faible intérêt pour l'application du modèle (Cao and Jusko, 2012).

La distribution d'un xénobiotique dans un compartiment peut être décrite comme étant soit limitée par le débit plasmatique du tissu, soit limitée par la perméabilité de la membrane physiologique (voir Figure 9).

Le **modèle à débit limité** est utilisé principalement pour les petites molécules lipophiles (PM <300 Da) (Lin *et al.*, 2016) qui sont capables de passer facilement les membranes physiologiques par diffusion passive. Dans ce cas, le débit plasmatique du tissu devient le processus limitant la distribution de la molécule dans le tissu. Une fois dans le tissu, la distribution de la molécule est instantanée et homogène.

Le **modèle à perméabilité limitée** est généralement utilisé pour les larges molécules polaires qui ont des difficultés pour pénétrer les tissus. Dans ce cas, la distribution de la molécule est limitée par le processus de perméabilité à travers les membranes vasculaires et/ou cellulaires (plus que par le débit plasmatique du tissu) (Jones, Gardner and Watson, 2009). La distribution de la molécule dans le tissu n'est pas instantanée mais nécessite un certain temps.

Ce temps de passage peut être schématisé dans les modèles PBPK en considérant des sous-compartiments représentant l'espace vasculaire (vasc), l'eau extra-cellulaire (EW pour *extracellular water*) représentant l'espace interstitiel contenant les cellules, et l'eau intra-cellulaire (IW pour *intracellular water*) représentant le cytoplasme des cellules.

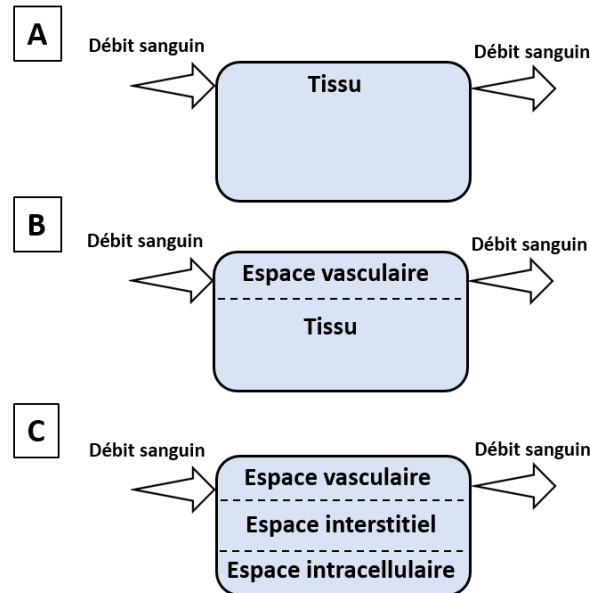


Figure 9: Modèles PBPK à débit limité (A), à perméabilité limitée avec deux (B) ou trois (C) compartiments. Adapté de (Viel, 2016).

❖ Expression mathématique

Le modèle est décrit par un système d'équations mathématiques différentielles qui permettent de détailler le profil pharmacocinétique (ADME) d'une molécule au cours du temps dans chaque tissu, tout en respectant la loi d'action de masse explicitée par l'équation de Fick. Globalement, le système du modèle entier doit respecter l'équilibre de masse : la somme des débits sanguins des tissus (connectés en parallèle) doit être égale au débit cardiaque, la somme des poids (généralement exprimés en volumes en prenant en compte la densité) des tissus doit être égale au poids total de l'individu étudié, la somme des quantités de xénobiotique présentes dans les différents tissus et fluides ainsi qu'excrétées ou métabolisées doit être égale à la fraction biodisponible de la dose administrée dans le système.

Pour un modèle à débit limité

La dérivée de la quantité de molécule (A_{tissue}) en fonction du temps (t) dans un tissu non-éliminateur (sauf le poumon) dans le cas d'une distribution limitée par le débit est décrite par l'équation suivante (Eq.16).

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = V_{tissue} \times \frac{dC_{tissue}}{dt} = Q_{tissue} \times (C_{arterial} - C_{venous}) \quad (16)$$

avec V_{tissue} le volume du tissu, C_{tissue} la concentration tissulaire, Q_{tissue} le débit sanguin du tissu, $C_{arterial}$ et C_{venous} les concentrations artérielles et veineuses.

La concentration veineuse s'exprime en fonction du coefficient de partage tissu-plasma (k_{tissue} , égal au ratio de concentrations tissulaires/ plasmatiques) et du ratio des concentrations entre le sang total et le plasma (BP, voir section 2) (Eq.17).

$$C_{venous} = \frac{C_{tissue}}{k_{tissue}} \times BP \quad (17)$$

et l'Eq.16 devient alors :

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = Q_{tissue} \times \left(C_{arterial} - \frac{C_{tissue}}{k_{tissue}} \times BP \right) \quad (18)$$

Dans le cas d'un tissu qui a la capacité d'éliminer la molécule (classiquement le foie ou les reins), une clairance (CL_{tissue}) est incorporée à l'Eq.18. Cette clairance est liée aux concentrations artérielles et ne peut dépasser le débit plasmatique de l'organe (Eq.19) (Upton, Foster and Abuhelwa, 2016).

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = Q_{tissue} \times \left(C_{arterial} - \frac{C_{tissue}}{k_{tissue}} \times BP \right) - CL_{tissue} \times C_{arterial} \quad (19)$$

L'élimination peut également être représentée par un ratio d'extraction (ER_{tissue} pour *extraction ratio*). La relation entre la clairance et le ER_{tissue} est représentée par l'Eq.20.

$$ER_{tissue} = \frac{CL_{tissue}}{Q_{tissue}} \quad (20)$$

où la clairance tissulaire peut être obtenue dans la littérature, estimée à partir de données expérimentales *in vivo* ou *in vitro*. Si la clairance dont on dispose est une clairance plasmatique, il convient de la convertir en clairance sanguine à l'aide du paramètre BP (Eq.21).

$$CL_{blood} = \frac{CL_{plasma}}{BP} \quad (21)$$

Pour un modèle à perméabilité limitée

Comparé aux modèles à débit limité, les modèles à perméabilité limitée nécessitent des équations mathématiques plus complexes et des paramètres supplémentaires (Ball *et al.*, 2012). La dérivé de la quantité de molécule en fonction du temps dans un tissu à perméabilité limitée (non éliminateur) est décrite par les équations suivantes (Eq.22 à 24).

$$\frac{dA_{vasc}}{dt} = Q_{tissue} \times \left(C_{arterial} - \frac{C_{vasc}}{k_{tissue}} \times BP \right) - PS_{passive} \times (Cu_{vasc} - Cu_{tissue}) \quad (22)$$

$$PS_{passive} = P_{app} \times S \times T_w \quad (23)$$

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = PS_{passive} \times (Cu_{vasc} - Cu_{tissue}) \quad (24)$$

avec Cu et C_{vasc} les concentrations libre et vasculaire; $PS_{passive}$ la vitesse de transfert passif bidirectionnel, S la surface d'échange sang-tissu, T_w le poids du tissu.

Le mouvement de la molécule entre les sous-compartiments est représenté ici par une diffusion passive bidirectionnelle, estimée par des expérimentations *in vitro* (P_{app}) de transport à travers une monocouche de cellules (ou un système PAMPA, voir section 1.4.3.1).

Indépendamment du modèle choisi, les équations peuvent être complexifiées en ajoutant par exemple des liaisons aux constituants cellulaires ou des transports actifs, afin de tenir compte des processus spécifiques de la molécule étudiée (Watanabe *et al.*, 2009; Jamei *et al.*, 2014; Viel, 2018).

2.2.2. Implémentation dans un logiciel

Le modèle est ensuite implémenté dans un logiciel informatique. Une revue des différents logiciels utilisés pour le développement de modèles PBPK a été publiée par Rowland *et al* (Rowland, Peck and Tucker, 2011) et certains d'entre eux sont brièvement décrits ci-dessous.

Les logiciels, tels que GastroPlusTM (Simulation Plus, Inc., Lancaster, CA), Simcyp[®] simulator (Simcyp Ltd, Sheffield, United Kingdom) et PK-Sim[®] (Bayer Technology Services, Leverkusen, Germany) possèdent une interface graphique simplifiée et conviviale avec des bibliothèques de modèles déjà construits. Une fois la structure du modèle choisie dans la bibliothèque, il faut alors renseigner les valeurs des paramètres physiologiques (la majorité des données physiologiques et anatomiques sur les espèces connues est déjà renseignée) et physico-chimiques. Ces logiciels sont assez simples d'utilisation mais sont difficilement adaptables à des espèces, des organes ou des voies d'administrations non implémentés dans leurs bibliothèques.

D'autres logiciels, tels que Monolix[®], R[®], NONMEM[®], souvent utilisés en pharmacocinétique pour établir des modèles compartimentaux, permettent de coder directement les équations et de renseigner les valeurs des paramètres associés. Ils ont pour avantage d'être plus flexibles et de permettre la construction d'un modèle innovant, pour des espèces peu connues. Cependant ils requièrent de documenter soi-même les données physiologiques propres à l'espèce d'étude.

2.2.3. Paramétrisation du modèle

Les paramètres du modèle PBPK peuvent être répartis en deux catégories : (i) les paramètres physico-chimiques et biologiques-pharmacologiques qui dépendent de la molécule (fraction libre plasmatique et tissulaire, ER, coefficient de partage tissu :plasma, paramètres physico-chimiques,...), (ii) les paramètres physiologiques spécifiques à l'espèce et indépendants de la molécule (volumes et débits de perfusion des tissus). Ces paramètres variés peuvent être obtenus grâce à des expérimentations *in vivo* ou *in vitro*, une calibration du modèle (ajustement des données expérimentales *in vivo*), une estimation par des modèles *in silico*, une extrapolation à partir d'autres espèces ou une combinaison de ces différentes méthodes (Nestorov, 2007). Quelques-uns de ces paramètres sont présentés ci-dessous.

❖ Paramètres spécifiques à la molécule

1. Les coefficients de partage tissu : plasma

Les coefficients de partage tissu : plasma (k_{tissue}) représentent le ratio des concentrations du xénobiotique entre le tissu et le plasma, à des conditions d'équilibre (*steady-state*). Théoriquement, ils prennent en compte l'affinité relative du xénobiotique pour les constituants des deux matrices. Une fois que le système a atteint l'équilibre, les flux de molécules s'échangeant entre les deux phases (plasma et tissu) sont identiques.

Les k_{tissue} peuvent être déterminés *in vivo* grâce à des mesures de concentrations plasmatiques et tissulaires et calculés comme le ratio des AUC ($\text{AUC}_{\text{tissue}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$) ou des concentrations à l'équilibre ($C_{\text{tissue}}/C_{\text{plasma}}$) ; ou par des techniques *in vitro* (Tremblay, Kim and Fisher, 2012). Brièvement, les k_{tissue} sont calculés à partir des rapports entre tissu- solution saline et sang- solution saline. Pour cela, les concentrations libres de la molécule sont mesurées dans une solution saline (PBS) avec matrice (tissu ou sang) (solution échantillon) ou sans matrice (solution de référence). Les concentrations libres des molécules hydrophiles ($\log P < 0,1$) sont déterminées par une technique d'ultrafiltration : les molécules libres passent par les pores du filtre tandis que les molécules liées aux protéines sont retenues dans l'ultrafiltrat ; tandis que les concentrations libres des molécules lipophiles ($\log P > 1,7$) sont déterminées par une technique de micro-extraction en phase solide : les molécules libres sont adsorbées sur une fibre de silice recouverte d'un polymère tandis que les molécules liées à la matrice sont éliminées par rinçage.

Depuis quelques années, le développement d'équations mécanistiques permettant de prédire des valeurs de k_{tissue} en fonction des propriétés physicochimiques des xénobiotiques et de la composition des tissus a facilité l'utilisation des modèles PBPK. Le premier modèle *in silico* a été développé par Poulin *et al* (Poulin and Theil, 2000; Poulin, 2001) puis modifié par Berezhkovskiy (Berezhkovskiy, 2004). Il décrivait la liaison non spécifique de la molécule aux lipides (à partir du $\log P$ ou $\log D$) et la liaison spécifique réversible aux protéines plasmatiques et tissulaires (f_{u} peut être estimé à partir de $f_{\text{u,p}}$). Ces équations ne considèrent qu'une distribution par voie passive de la molécule dans le tissu.

Plus tard, Rodgers et Rowland ont étendu et amélioré ce modèle en ajoutant la notion d'ionisation et de charge de la molécule (pH , pKa) (Rodgers, Leahy and Rowland, 2005; Rodgers and Rowland, 2006). Le modèle *in silico* de Rodgers et Rowland tient compte de 4

processus principaux : (i) la répartition des molécules entre l'EW et IW (BP, f_{up}); (ii) les interactions avec les protéines tissulaires extracellulaires pour les molécules neutres (fixées aux lipoprotéines) ou les acides (fixés à l'albumine) ; (iii) le partage de toutes les molécules sous forme non-ionisées entre les lipides neutres et les phospholipides neutres (composés de 30% de lipides et de 70% d'eau), (iv) les interactions électrostatiques entre les bases sous forme ionisée (chargées positivement) et les phospholipides acides (tête hydrophobe chargée négativement) (voir Figure 10A). La distribution de la molécule dans le tissu est médiée par la diffusion passive des formes libres et non-ionisées (caractérisées par les ratios d'ionisation X, W, selon le milieu considéré, voir Eq. 26, 27). Cette méthode différencie les bases et zwitterions avec au moins un pKa basique ≥ 7 (zwitterions du groupe 1), qui vont être majoritairement ionisés au pH physiologique et les acides et zwitterions sans pKa basique ≥ 7 (zwitterions du groupe 2).

Les équations permettant de prédire les k_{tissue} par la méthode Rodgers et Rowland en fonction du type de molécule sont présentées ci-dessous (Eq. 25 à 31).

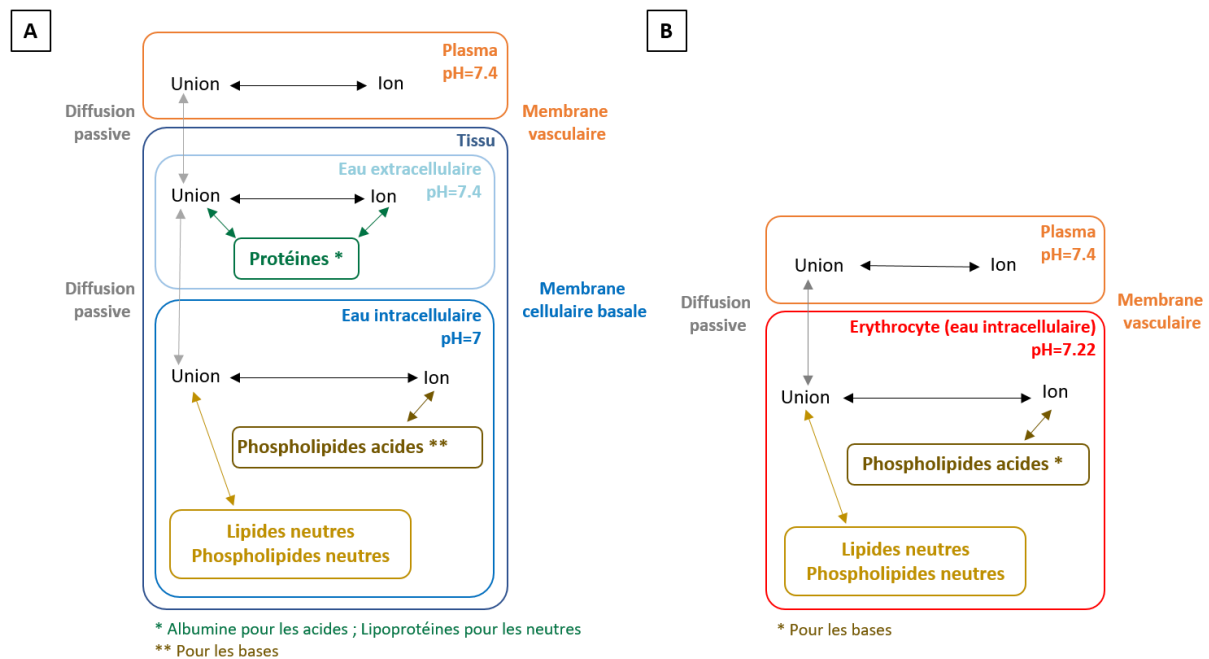


Figure 10: Schéma de la distribution d'un xénobiotique dans un tissu (A) et dans un érythrocyte (B), suivant les hypothèses de Rodgers et Rowland.

Adapté de (Rodgers, Leahy and Rowland, 2005; Rodgers and Rowland, 2006)

Pour les acides, molécules neutres, et bases faibles (pas de pKa basique >7) :

$$k_{tissue} = ku_{tissue} \times fu_p$$

$$= \left[f_{EW} + \frac{X}{W} \times f_{IW} + ka_{protein} \times protein_{tissue} + \left(\frac{P \times f_{NL} + (0,3 \times P + 0,7) \times f_{NP}}{W} \right) \right] \times fu_p \quad (25)$$

$$W = 1 + 10^{pKa_{base} - pH_p} + 10^{pH_p - pKa_{acid}} \quad (26)$$

$$X = 1 + 10^{pKa_{base} - pH_{IW}} + 10^{pH_{IW} - pKa_{acid}} \quad (27)$$

$$ka_{protein} = \left(\frac{1}{fu_p} - 1 - \left(\frac{P \times f_{NL,P} + (0,3 \times P + 0,7) \times f_{NP,P}}{W} \right) \right) \times \frac{1}{protein_p} \quad (28)$$

avec ku_{tissue} : coefficient de partage pour la fraction libre ; fu_p : fraction libre plasmatique ; f_{EW} : la fraction d'eau extra-cellulaire ; f_{IW} : la fraction d'eau intra-cellulaire ; X : le ratio d'ionisation dans l'eau intra-cellulaire ; W : le ratio d'ionisation dans le plasma ; P : le coefficient de partage octanol:eau ($10^{\log P}$) pour les tissus non-adipeux ou le coefficient de partage huile végétale :eau pour les tissus adipeux ; $protein_{tissue}$: la concentration de protéines dans l'eau extracellulaire ; $ka_{protein}$: la constante d'association des protéines dans l'eau extra-cellulaire ; f_{NL} : la fraction des lipides neutres ; f_{NP} : la fraction des phospholipides neutres ; pKa_{acid} : la constante d'ionisation acide et pKa_{base} : la constante d'ionisation basique ; pH_{IW} : le pH de l'eau intra-cellulaire ; pH_p : le pH du plasma ; $protein_p$: la concentration de protéines dans le plasma.

Pour les bases fortes à modérées (au moins un pKa basique >7) :

$$k_{tissue} = \left[f_{EW} + \frac{X}{W} \times f_{IW} + \left(\frac{ka_{AP} \times AP_{tissue} \times 10^{pKa_{base} - pH_{IW}} + 10^{pH_{IW} - pKa_{acid}}}{W} \right) + \left(\frac{P \times f_{NL} + (0,3 \times P + 0,7) \times f_{NP}}{W} \right) \right] \times fu_p \quad (29)$$

$$ka_{AP} \quad (30)$$

$$= \frac{W \times (ku_{muscle} - f_{EW,muscle}) - X \times f_{IW,muscle} - (P \times f_{NL,muscle} + (0,3 \times P + 0,7) \times f_{NP,muscle})}{AP_{muscle} \times (X - 1)}$$

$$Ku_{muscle} = \frac{K_{muscle}}{fu_p} \quad (31)$$

avec AP_{tissue} : la concentration de phospholipides acides dans le tissu, ka_{AP} : la constante d'association des phospholipides acides dans le tissu, qui est calculée grâce du ka_{AP} dans le muscle à partir de son coefficient de partage k_{muscle} .

Graham *et al* ont montré que le modèle de Rodgers et Rowland prédit les k_{tissue} de différentes classes de molécules plus précisément que les autres modèles *in silico* (Graham *et al.*, 2012). Néanmoins quelques hypothèses ne sont pas prises en compte dans ce modèle comme le transport actif à travers la membrane (Holt *et al.*, 2019; Yau *et al.*, 2020).

D'autres méthodes telles que des modèles QSAR (Schmitt, 2008; Ruark *et al.*, 2014) sont également possibles pour déterminer le k_{tissue} .

2. Le ratio sang total et plasma

Le ratio des concentrations entre le sang total et le plasma (BP pour *blood to plasma ratio*) est un paramètre important du modèle PBPK car les modèles sont généralement paramétrés avec des débits sanguins alors que certains paramètres sont exprimés en fonction de concentrations plasmatiques. Il est exprimé en fonction de l'hématocrite (Ht) et de la fixation aux érythrocytes (EP, le ratio entre les concentrations érythrocytaires et plasmatiques, *erythrocytes to plasma ratio*) (Eq. 32). BP permet de convertir les paramètres plasmatiques en paramètres sanguins dans les équations différentielles du modèle (voir Eq. 18). Il peut être estimé *in silico* tel que les k_{tissue} .

$$BP = (EP - 1) \times Ht + 1 = (k_{u_{BC}} \times f_{u_p} - 1) \times Ht + 1 \quad (32)$$

avec $k_{u_{BC}}$ le coefficient de partage non lié dans les érythrocytes et f_{u_p} la fraction libre plasmatique.

Le coefficient de partage non lié dans les érythrocytes ($k_{u_{BC}}$) peut être calculé grâce aux équations de Rodgers et Rowland (Rodgers and Rowland, 2006) en considérant le partage dans l'IW (les érythrocytes ne possèdent pas d'EW), la fixation du xénobiotique au phospholipides acides (pour les bases, Eq.33) et aux lipides et phospholipides neutres (pour les bases et les acides, Eq.34) (voir Figure 10B).

$$k_{u_{BC}} = \frac{V}{W} \times f_{IW,BC} + \frac{k_{a_{AP,BC}} \times A_{P,BC} \times (V-1)}{W} + \frac{P \times f_{NL,BC} + (0,3 \times P + 0,7) \times f_{NP,BC}}{W} \text{ pour les bases} \quad (33)$$

$$k_{u_{BC}} = \frac{V}{W} \times f_{IW,BC} + \frac{P \times f_{NL,BC} + (0,3 \times P + 0,7) \times f_{NP,BC}}{W} \text{ pour les acides} \quad (34)$$

avec le ratio d'ionisation dans les érythrocytes : $V = 1 + 10^{pK_{a_{Base}} - pH_{BC}} + 10^{pH_{BC} - pK_{a_{Acid}}}$

3. La clairance

La valeur de clairance (CL) systémique peut être déterminée à partir de données expérimentales (concentrations plasmatiques) par des méthodes compartimentales ou non-compartimentales classiques. Elle peut également être extrapolée grâce à des méthodes allométriques (Mahmood, 2007; Sharma and McNeill, 2009). La clairance intrinsèque hépatique ($CL_{int,hepatic}$), elle, peut être estimée à partir de données expérimentales *in vitro* (hépatocytes, microsomes) (Houston, 1994) et sa conversion en clairance *in vivo* nécessite la prise en compte de facteurs correctifs (nombre d'hépatocytes, poids du foie, etc). La clairance rénale peut être estimée à partir de la filtration glomérulaire (dépendante de la fraction libre plasmatique et du débit sanguin rénal), et de données de transport de sécrétion (dépendante de transporteurs actifs) et de réabsorption tubulaire (diffusion passive et transporteurs actifs) déterminées *in vivo* ou *in vitro*.

4. Le volume de distribution

Le volume de distribution à l'état d'équilibre (V_{ss}) correspond à la somme du volume plasmatique et du produit de chaque k_{tissue} avec le volume de son tissu (Eq.35) (Rodgers and Rowland, 2007; Bois, Jamei and Clewell, 2010).

$$V_{ss} = V_p + V_{BC} \times EP + \sum V_{tissue} \times k_{tissue} \quad (35)$$

Avec V_p , V_{BC} et V_{tissue} les volumes plasmatique, érythrocytaire et tissulaire, EP : le coefficient de partage érythrocyte:plasma et k_{tissue} le coefficient de partage tissu :plasma.

Il peut également être estimé *in silico* par des modèles empiriques compartimentaux ou par une analyse non-compartimentale des données observées *in vivo*.

❖ Paramètres spécifiques à l'espèce

Des bases de données sur les valeurs des débits plasmatiques, volumes (et parfois composition) tissulaires sont disponibles pour l'homme (Brown *et al.*, 1997; Price *et al.*, 2003), les espèces pré-cliniques (rat, souris, chien, primate non humain) (Brown *et al.*, 1997; Clewell and Clewell, 2008) et certains animaux de production (vache, mouton, cochon, chèvre) (Upton, 2008; Leavens, 2012, 2012; Lautz, Dorne, *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020).

Autrement, les mesures des débits cardiaques peuvent être réalisées directement chez l'animal grâce à des traceurs, des sondes de débit (Upton, Grant and Ludbrook, 1994) ou des microsphères (Robertson and Hlastala, 2007), et chez l'homme par des méthodes d'ultrason (exemple doppler) ou d'imagerie (Cosgrove *et al.*, 2001).

Lorsque le paramètre est manquant pour l'espèce d'intérêt, il peut également être extrapolé grâce à des méthodes allométriques (à partir du poids corporel notamment) (Boxenbaum, 1980; Upton, 2008).

2.3. Calibration et évaluation du modèle

2.3.1. Calibration et prédiction

❖ **Calibration**

Plutôt que d'estimer certains paramètres (non disponibles dans la littérature) expérimentalement ou via des méthodes *in silico*, il est possible de les intégrer dans le modèle PBPK et de les estimer à partir de données expérimentales. On parle alors de calibration du modèle (Lin *et al.*, 2016). Néanmoins, les données qui ont servi à la calibration du modèle ne pourront pas servir à son évaluation et sa validation (voir section 2.3.2).

❖ **Prédiction**

Une fois la structure du modèle déterminé, les paramètres définis et les équations différentielles résolues, le modèle peut prédire le devenir du xénobiotique dans les différents tissus du modèle suivant un schéma posologique particulier renseigné dans le logiciel (ou le code).

❖ **Variabilité et incertitude**

La variabilité correspond aux **différences inter-individuelles** au niveau anatomique et physiologique. Ces différences peuvent entraîner des variations dans la PK d'un xénobiotique (Bois, Jamei and Clewell, 2010). Pour décrire la variabilité inter-individuelle (IIV pour *inter individual variability*) dans un modèle PBPK, chaque paramètre physiologique peut être caractérisé par sa distribution (généralement normale ou log-normale) définie par une moyenne et une variance (standard déviation ou coefficient de variation) trouvées dans la littérature à

partir de populations et d'individus réels. Des simulations de **Monte Carlo** permettent, via des tirages au sort multiples au sein des différentes distributions de paramètres, de prédire la distribution d'une variable d'intérêt (par exemple la concentration dans un tissu donné) pour une population virtuelle (Price *et al.*, 2003). Certaines covariables explicatives de l'IIV peuvent être intégrées dans le modèle, par exemple la variation des volumes physiologiques en fonction de l'âge, afin d'ajuster les simulations à certaines sous-populations.

L'**incertitude** diffère de la variabilité mais leurs effets peuvent se confondre (et s'amplifier). Elle correspond au manque de connaissance, par exemple au sujet de la fidélité de la méthode de dosage, de l'étude d'un échantillon limité de la population (et pas forcément représentatif) ou de l'incapacité d'un modèle à représenter précisément un système complexe (Bois, Jamei and Clewell, 2010). Tout comme pour les paramètres physiologiques, on peut prendre en compte l'incertitude sur un paramètre d'un modèle en le définissant par une distribution (caractérisée par une estimation de son espérance et une erreur standard). La réalisation de simulations (par exemple Monte Carlo) permet alors la construction d'un intervalle de confiance pour la variable d'intérêt (concentration dans un tissu). Les modèles statistiques à effets mixtes peuvent distinguer en partie l'incertitude et l'IIV.

Une différence majeure entre variabilité et incertitude est que cette dernière peut être diminuée en augmentant/raffinant les données alors que la première ne peut être réduite (seulement mieux caractérisée).

Certains auteurs ont ajouté de l'IIV et/ou de l'incertitude sur leurs paramètres, obtenant ainsi un modèle PBPK de population, qui a pu être utilisé pour l'estimation de TA dans les tissus alimentaires d'origine animale (Wu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017, 2019; Riad *et al.*, 2021).

2.3.2. Evaluation

L'évaluation d'un modèle PBPK peut être réalisée en utilisant le modèle pour prédire une variable d'intérêt, par exemple des concentrations dans un tissu donné, et en les comparant à des données expérimentales qui n'ont pas servi à la calibration du modèle. La capacité du modèle à reproduire ces données détermine si le modèle doit être optimisé (repartir en calibration sur des jeux de données supplémentaires) ou considéré comme valide. Les critères de validation d'un modèle PBPK ont été publiés par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2010) et aussi l'EMA (EMA, 2018).

L'importance relative des différents paramètres du modèle peut ensuite être évaluée par une analyse de sensibilité (Zhang *et al.*, 2015).

L'analyse de sensibilité locale fournit une mesure de la sensibilité d'une prédiction du modèle (par exemple le C_{max} ou l'AUC) à de faibles changements de la valeur d'un paramètre du modèle (par exemple variation de 10% de la clairance) (Peters, 2012). Un coefficient de sensibilité relatif (RS) est estimé (Eq.36). Le paramètre d'entrée évalué (I pour *input*) est considéré comme ayant un effet significatif sur la prédiction du modèle (O pour *output*) si son coefficient est supérieur ou égal à 0,1 (la variation de I de 10% a entraîné une variation de O de 1%).

$$RS_{ij} = \frac{\partial O_j}{\partial I_i} \times \frac{I_i}{O_j} \quad (36)$$

avec O_j : la valeur nominale du paramètre d'entrée, I_i : la valeur nominale du paramètre de sortie, ∂ : la dérivée de chaque paramètre.

Avec cette analyse locale, les interactions entre les paramètres ne peuvent cependant pas être évaluées.

L'analyse de sensibilité globale (GSA) étudie les interactions et l'impact des variations simultanées des paramètres du modèle sur les prédictions du modèle. Elle fait varier l'ensemble des paramètres simultanément et estime l'effet principal du paramètre d'entrée ainsi que son effet total. La différence entre ces deux effets correspond à la prise en compte dans l'effet total des variations du paramètre d'intérêt simultanément avec les variations des autres paramètres d'entrée. En général, on considère que le paramètre d'entrée a un effet significatif sur la prédiction du modèle lorsque l'effet total est supérieur à 0,1 (Jarrett *et al.*, 2016). La GSA a été montrée plus robuste que l'analyse locale, en quantifiant la contribution relative de chaque paramètre à la sensibilité globale du modèle (McNally, Cotton and Loizou, 2011). Plusieurs types de GSA existent et peuvent être classifiées en deux groupes : les méthodes restreintes, couramment utilisées, qui supposent l'indépendance des paramètres (tels que Sobol, eFAST, PRCC, Morris), et les méthodes qui permettent de prendre en compte les corrélations entre paramètres (HDMR) beaucoup plus complexes et donc moins utilisées (Liu *et al.*, 2020). Avec l'hypothèse de l'indépendance des paramètres, les méthodes restreintes peuvent cependant entraîner une combinaison de paramètres irréalistes en utilisant un échantillonnage aléatoire. Par exemple, la méthode eFAST (*extended Fourier amplitude sensitivity test*), une des plus utilisée, est basée sur la variance. Elle ne suppose pas de relation entre les entrées et les sorties

du modèle mais consiste à quantifier la contribution de la variance de chaque variable d'entrée sur la variable de sortie (Liu *et al.*, 2020).

L'analyse de sensibilité peut permettre de simplifier un modèle PBPK jugé trop complexe, en ne gardant que les paramètres les plus influents et le réduire ainsi un modèle type *minimal PBPK*.

Une fois validé, le modèle PBPK peut être utilisé notamment pour simuler d'autres schémas posologiques ou pour des extrapolations inter-espèces ou inter-molécules, en ajustant les paramètres du modèle.

2.4. Limites des modèles PBPK

Du fait de l'intégration d'un nombre croissant de processus biologiques et pharmacologiques, les modèles PBPK développés sont de plus en plus complexes et peuvent présenter quelques limites :

(i) Un problème d'identifiabilité des paramètres peut se poser dans les modèles PBPK. En effet, on peut vouloir détailler le plus possible les différents mécanismes impliqués dans la PK des molécules étudiées, mais se pose alors la question de la difficulté de connaître les valeurs des paramètres associés à ces mécanismes (par exemple la quantité de protéines dans un organe, l'affinité d'une molécule pour une protéine donnée, etc.). Complexifier le modèle peut alors aboutir à ajouter de l'incertitude, et potentiellement détériorer la capacité prédictive de ce modèle (Sugano, 2021). La validation du modèle avec des données expérimentales est importante dans le choix d'inclure ou pas certains mécanismes. L'analyse de sensibilité est un outil qui permet de déterminer quels paramètres ont le plus d'influence sur les prédictions du modèle. Toutefois, les modèles PBPK sont souvent utilisés pour faire des extrapolations et prédire la PK d'autres molécules, sans nécessairement disposer de données expérimentales. Pour ces extrapolations, l'inclusion d'un maximum de mécanismes potentiellement impliqués dans la PK des molécules d'intérêt peut alors être importante, allant à l'encontre du principe de parcimonie habituellement appliqué en modélisation. Il convient alors de s'assurer que les valeurs de paramètres utilisés sont physiologiques et applicables aux molécules pour lesquelles on peut être amené à faire des extrapolations (Tsamandouras, Rostami-Hodjegan and Aarons, 2015).

(ii) En raison du lien qui relie bon nombre des paramètres physiologiques (par exemple le débit cardiaque, le poids, le débit sanguin d'un organe), ceux-ci peuvent être fortement corrélés, ce qui peut entraîner un biais dans les prédictions du modèle (Liu *et al.*, 2020).

De plus amples efforts doivent être fournis (une harmonisation doit être apportée) dans les techniques d'évaluation et de qualification des modèles PBPK (Nestorov, 2007). Par exemple, il est difficile d'évaluer la performance de différents modèles lorsque ceux-ci utilisent au choix une analyse de sensibilité locale ou globale, ou lorsque les codes informatiques ne sont pas publiés (Lautz *et al.*, 2019).

Enfin, le développement de modèles PBPK demande un investissement d'effort, de temps et de ressources ainsi qu'une formation à certains logiciels ou à la programmation informatique (Nestorov, 2007).

2.5. Applications

2.5.1. Les modèles PBPK en médecine humaine

Les modèles PBPK sont utilisés dans la recherche et le développement des médicaments humains. En phase préclinique, ils sont utilisés notamment pour la sélection d'un médicament candidat, la détermination de la 1^{ère} dose chez l'homme, l'évaluation des interactions médicamenteuses et le design de schémas posologiques optimaux. En phase clinique, une fois que le modèle est validé grâce à des données cliniques, il peut être utilisé pour évaluer l'impact de différents schémas posologiques, de différentes interactions médicamenteuses, ou de covariables dans la population d'intérêt (Jones, Gardner and Watson, 2009; Jones and Rowland-Yeo, 2013).

2.5.2. Les modèles PBPK en médecine vétérinaire

En médecine vétérinaire, l'évaluation des risques chimiques pour la santé animale (animaux de compagnie ou animaux de production) et la sécurité sanitaire des aliments (transfert de xénobiotiques dans la chaîne alimentaire) fait face à de nombreux challenges tels que la prise en compte des différences *inter* et *intra* espèces (Dorne and Fink-Gremmels, 2013) et la prédiction de la déplétion des résidus de xénobiotiques dans certains tissus, le lait et les œufs, et des TA chez les animaux destinés à l'alimentation (Henri *et al.*, 2017). Les modèles PBPK sont des outils très intéressants pour prédire les concentrations de xénobiotiques dans les

tissus cibles surveillés par les autorités réglementaires vétérinaires et se sont révélés plus prometteurs pour fournir des estimations du TA que les méthodes statistiques établies il y a quelques décennies (Chevance, 2017; Li *et al.*, 2017, 2018, 2019; Riad *et al.*, 2021). Deux revues récentes présentent les divers modèles PBPK publiés en médecine vétérinaire et utilisés dans l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments (Lin *et al.*, 2016; Lautz *et al.*, 2019). La majorité des modèles PBPK sont développés pour une seule molécule (généralement antibiotiques ou contaminants l'environnement), dans une espèce particulière et pour répondre à un besoin/une problématique spécifique. Seuls quelques modèles génériques existent, développés pour des molécules lipophiles chez des vaches, vaches laitières, chèvres et truies (MacLachlan, 2009) ; chez des poules pondeuses (Lautz, Nebbia, *et al.*, 2020), des poulets, des canards et des dindes (MacLachlan, 2010) pour comparer leur exposition aux molécules et leurs résidus tissulaires ; chez les poissons (Grech *et al.*, 2019), pour évaluer des facteurs physiologiques et environnementaux (effet de la croissance, de la température de l'eau, oxygène disponible) sur la toxicocinétique des produits.

Concernant les ruminants domestiques, plusieurs modèles PBPK ont été développés chez la vache (Achenbach, 1998; Leavens *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018), considérée comme un animal majeur dans la production d'aliments (lait, viande) (EMA, 2016). A l'inverse, la chèvre est considérée comme un animal mineur dans la production d'aliments (lait, viande) et seulement deux modèles PBPK ont été développés (Leavens, 2012; Riad *et al.*, 2021). Pour le mouton, pourtant considéré comme une espèce majeure (EMA, 2016), deux modèles PBPK sont actuellement disponibles (Craigmill, 2003; Riad *et al.*, 2021).

2.5.3. Modèles PBPK sur le passage dans le lait

Depuis quelques années, plusieurs modèles PBPK sur l'excrétion lactée ont été développés. Les principaux modèles en médecine vétérinaire et humaine seront présentés dans ce paragraphe.

❖ Médecine vétérinaire

Plusieurs modèles PBPK prennent en compte l'excrétion dans le lait de vache (Derks *et al.*, 1994; MacLachlan, 2009; Leavens *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018; Woodward and Whittem, 2019). Les plus récents sont présentés ici.

Le modèle de **Leavens et al** (2014) décrit l'excrétion de la flunixin (anti-inflammatoire non stéroïdien) chez les vaches et évalue l'influence de la voie d'administration (IV, IM et SC) sur les résidus dans le foie et le lait (Leavens et al., 2014). Le modèle comprend un compartiment lait (voir Figure 11). Le volume de lait (V_{milk}^{total}) a été modélisé comme un événement épisodique qui augmente de manière linéaire au cours du temps en fonction de l'intervalle entre les traites (IMI) (Eq.37). V_{milk}^{total} correspond à la somme du volume de lait collecté pendant la traite ($V_{milk}^{collected}$) et du volume résiduel (fraction constante du V_{milk}^{total}) qui reste dans la glande après la traite ($V_{milk}^{residual}$). L'élimination dans le lait a été modélisée par une clairance de premier ordre (Cl_{milk}), estimée en moyennant différentes valeurs trouvées dans la littérature. La vitesse d'élimination dans le lait (R_{elim}^{milk}) de la concentration libre plasmatique (Cu_{plasma}) est représentée dans l'Eq.38 ci-dessous.

$$V_{milk}^{total} = R_{milk} \times IMI + V_{milk}^{residual} \quad (37)$$

$$R_{elim}^{milk} = BW \times Cl_{milk} \times Cu_{plasma} \quad (38)$$

avec R_{milk} le taux de production de lait, basé sur le volume de lait collecté sur un intervalle de traite (12h), R_{elim}^{milk} la dérivée de la quantité dans le lait (A_{milk}) en fonction du temps et la concentration dans le lait est estimée par A_{milk}/V_{milk} .

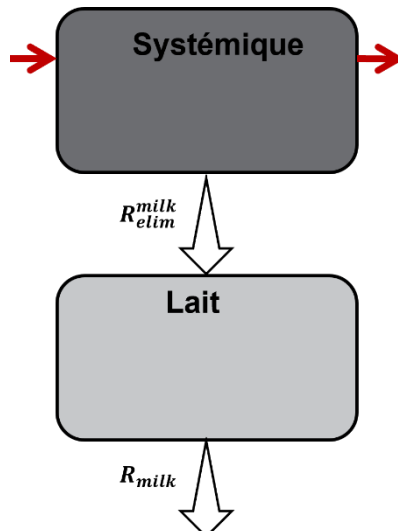


Figure 11: Modèle PBPK de l'excrétion lactée de la flunixin chez la vache développé par Leavens. Adapté de (Leavens et al., 2014).

Le modèle a permis de prédire correctement les données observées dans le plasma ($R^2=0,88$) et le lait ($R^2=0,81$) (Leavens *et al.*, 2014). D'après l'analyse de sensibilité locale, les prédictions dans le lait sont sensibles à la production de lait (R_{milk} , estimé par la médiane des valeurs obtenues dans la littérature) et à la Cl_{milk} . Ce résultat est confirmé par plusieurs études qui ont souligné que l'augmentation de la persistance des résidus dans le lait était liée à une diminution de la production laitière (Mercer *et al.*, 1970; Whittem, 2012). Pour conclure, le modèle de Leavens *et al* est un modèle simplifié qui prend en compte l'excrétion lactée (caractérisée par Cl_{milk} , estimée par le modèle) de la molécule libre dans le plasma. Ce modèle considère une augmentation linéaire du volume de lait mais ne prend pas en compte la physiologie de la glande mammaire, de la sécrétion du lait ni de sa composition. Le transport actif et l'état d'ionisation de la flunixin ne sont également pas représentés dans ce modèle.

Le modèle de Li *et al* (2018) décrit l'excrétion lactée de la pénicilline G chez les vaches après des administrations IMM et IM. Le modèle comprend 8 compartiments dont la glande mammaire (Li *et al.*, 2018). L'absorption de la pénicilline G du lait vers le sang et son excrétion vers le lait sont considérées pour représenter les deux voies d'administration (IMM et IM). Deux modèles ont été développés pour la glande mammaire (voir Figure 12) : (i) un modèle où l'espace laitier dans la mamelle est considéré comme 1 seul compartiment où le lait est excrété et stocké ; (ii) un modèle où l'espace laitier est divisé en 2 compartiments : l'alvéole où le lait est sécrété et la citerne où le lait excrété, et où la pénicilline G se distribue entre les deux compartiments.

La production de lait au cours du temps est modélisée par l'équation de Hill-Langmuir (Eq.39 pour le modèle à 1 compartiment, Eq.40 et 41 pour le modèle à 2 compartiments), dépendant du volume maximal de l'espace contenant le lait (V_{max} ou ALV_{max}), du temps pour atteindre 50% de ce volume maximal (s ou s_{alv}), du volume résiduel ($V_{residual}$, fixé à 4% de V_{max}) et du temps depuis la dernière traite (tm). Ces paramètres ont été fixés à partir de données expérimentales publiées précédemment (Davis *et al.*, 1998; Whittem, 2012).

Pour le modèle à 1 compartiment :

$$V_{milk} = V_{residual} + \frac{(tm \times V_{max})}{tm + s} \quad (39)$$

Pour le modèle à 2 compartiments :

$$V_{alveoli} = V_{residual} + \frac{(tm \times ALV_{max})}{tm + s_{alv}} \quad (40)$$

$$V_{cistern} = V_{max} - V_{alveoli} \quad (41)$$

Les deux modèles ont été validés (sur des données expérimentales), cependant c'est le modèle à 1 compartiment qui a été sélectionné comme modèle final. Le modèle à 1 compartiment permet de décrire les données aussi bien que le modèle à 2 compartiments, en évitant une sur-paramétrisation (les paramètres n'étant pas disponibles dans la littérature, ils doivent être estimés).

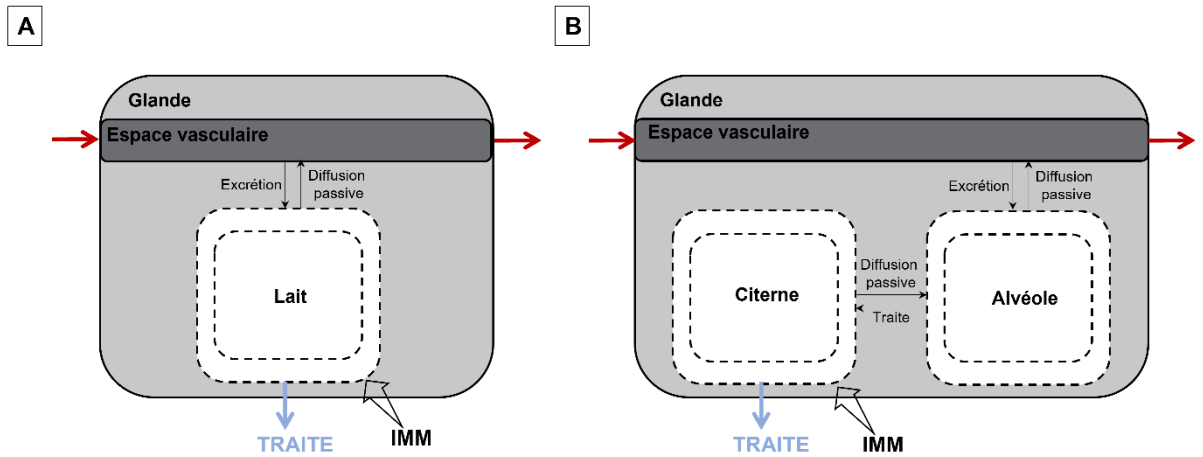


Figure 12: Modèles de la glande mammaire à 1 compartiment (A) ou 2 compartiments (B) développés par Li.

Adapté de (Li *et al.*, 2018).

L'absorption de la pénicilline G du lait vers le plasma (ou modèle systémique) est caractérisée par une diffusion passive (Eq.42, modèle linéaire d'ordre 1), tandis que l'excrétion de la fraction libre de pénicilline G du plasma vers le lait est modélisée par un transport actif médié par un transporteur (Eq.43, équation de Michaelis-Menten). Faute de données disponibles dans la littérature pour ces deux processus, les paramètres utilisés ont été estimés grâce aux données expérimentales. La variation de la quantité de pénicilline G dans la glande au cours du temps est présentée par l'Eq.44.

$$R_{absorption} = k_{absorption} \times A_{milk} \quad (42)$$

$$R_{excretion} = \frac{V_m \times \frac{C_{udder}}{k_{udder}}}{\frac{C_{udder}}{k_{udder}} + k_m} \quad (43)$$

$$\frac{dA_{udder}}{dt} = Q_{udder} \times \left(C_{u_{arterial}} - \frac{C_{udder}}{k_{udder}} \right) + R_{absorption} - R_{excretion} \quad (44)$$

avec $R_{absorption}$: le taux d'absorption à partir du lait, $k_{absorption}$: la constante de vitesse d'absorption, $R_{excretion}$: le taux d'excrétion dans le lait, V_m la vitesse maximale d'excrétion dans le lait et k_m : la concentration de pénicilline G pour atteindre 50% de V_m , A_{udder} et A_{milk} : la quantité de pénicilline G dans la mamelle et le lait, Q_{udder} : le débit sanguin de la mamelle et $C_{u_{arterial}}$ et C_{udder} : la concentration libre artérielle et la concentration totale dans la mamelle, k_{udder} : le coefficient de partage mamelle :plasma.

La variation de la quantité de pénicilline G dans le lait au cours du temps est présentée par l'Eq. 45 ci-dessous.

$$\frac{dA_{milk}}{dt} = R_{input,IMM} + R_{excretion} - R_{absorption} - R_{milking} \quad (45)$$

avec A_{milk} : le taux de variation de pénicilline G dans le lait, $R_{input,IMM}$: le taux d'entrée de pénicilline G via l'administration IMM, $R_{milking}$: le taux de variation de pénicilline G par les traites (dépend du rapport entre le volume de lait sécrété et le lait total dans les mamelles à chaque moment de la traite). La concentration de pénicilline G dans le lait correspond alors à A_{milk}/V_{milk} .

Le modèle prédit correctement les concentrations de pénicilline G dans le lait et le plasma après des administrations IMM et IM ($R^2 > 0,75$ et $MAPE < 40$, avec $MAPE$: *mean absolute percentage error*). L'analyse de sensibilité locale montre que l'AUC (0-24h) prédite dans le lait est sensible au V_{max} et au V_{50} de la production de lait, à la fraction du $V_{residual}$ et au V_m de l'excrétion dans le lait.

Pour conclure, le modèle de Li *et al* représente le processus épisodique de la production de lait, l'absorption de la pénicilline G du lait vers le sang par une diffusion passive (caractérisée par $k_{absorption}$) et l'excrétion du sang vers le lait via un transport actif (caractérisée par k_m et V_m). Cependant les paramètres utilisés pour la diffusion passive et l'excrétion sont estimés par le modèle et ne sont donc pas obligatoirement physiologiques. De plus, l'expression des

transporteurs liés à l'excrétion dans le lait n'a pas été renseignée. Le modèle à 2 compartiments est plus représentatif de la physiologie de la glande mammaire et du processus de sécrétion et de stockage du lait mais n'a pas été retenu en raison d'un manque de données pour renseigner les valeurs des paramètres (et la nécessité de diminuer l'incertitude liée à l'estimation de ces paramètres). Pourtant ce modèle à 2 compartiments permettrait d'étudier le mouvement de la pénicilline G (et autre xénobiotique) entre les deux composantes de la glande mammaire bovine (alvéole et citerne) ainsi que l'influence d'un état pathologique. Ni la fixation de la pénicilline G aux composants du tissu mammaire et aux composants du lait, ni l'état d'ionisation n'ont été considérés.

Enfin, le modèle de **Woodward et al** (2019) s'intéresse au passage de trois bêta-lactamines (BL) (pénicilline, céfuroxime, céphapirine et son métabolite) dans le lait de vache après administration IMM (Woodward and Whitem, 2019) (voir Figure 13). Le modèle incorpore la physiologie de la sécrétion du lait en détaillant l'alvéole et la citerne. Le volume de lait alvéolaire est modélisé par une fonction non linéaire (Eq.46) tel que celui du modèle à 2 compartiments présenté par Li et al (Li et al., 2018). L'alvéole commence à se remplir de lait immédiatement après la traite, tandis que la citerne reste vite pendant un certain temps (CIS_{delay}) avant de se remplir (Eq.47). L'alvéole et la citerne ont été définis pour chacun des 4 quartiers de la vache, contenant 29% du volume total pour les quartiers arrières et 21% pour les quartiers avant.

$$V_{alveoli} = V_{residual} + \frac{(tm \times ALV_{max})}{tm + ALV_{50}} \quad (46)$$

$$V_{cistern} = (tm - CIS_{delay}) \times CIS_{rate} \quad (\text{lorsque } tm - CIS_{delay} < 0, V_{cistern} = 0) \quad (47)$$

avec $V_{residual}$: le volume résiduel, ALV_{max} : le volume maximal du compartiment, ALV_{50} : le temps pour atteindre 50% de ALV_{max} , tm : le temps depuis la dernière traite, CIS_{rate} : le taux de remplissage de la citerne.

Après administration IMM, la distribution des BL est considérée instantanée entre la citerne et l'alvéole des 4 quartiers. La dose se répartit entre l'alvéole (F_{alv}) et la citerne ($1 - F_{alv}$). Une proportion (R) de la quantité de la molécule à la fin de l'intervalle de traite précédente est considérée comme restante dans l'alvéole. A l'inverse, la citerne est vide à $t=0$.

Les BL sont délivrées de l'alvéole vers la citerne proportionnellement au taux de remplissage de la citerne (Eq.48).

$$\frac{dX_{cistern}}{dt} = \frac{X_{alveoli}}{V_{alveoli}} \times \frac{dV_{cistern}}{dt} \quad (48)$$

avec $X_{cistern}$ et $X_{alveoli}$ la quantité de BL dans la citerne et l'alvéole et $V_{alveoli}$ le volume de l'alvéole.

Le modèle ne permettait pas de prédire correctement les données observées dans le lait. Un compartiment supplémentaire, noté **compartiment de rétention** et considéré comme étant l'adsorption des BL à l'épithélium alvéolaire, a donc été ajouté. Ce compartiment a un volume indépendant et est relié à l'alvéole par une clairance de premier ordre (Cl_{23}). Les BL sont redistribuées de ce compartiment vers l'alvéole par une constante de premier ordre (k_{32}). La variation de la quantité de BL dans le compartiment de rétention au cours du temps est présentée par l'Eq.49.

$$\frac{dX_{retention}}{dt} = \left(\frac{X_{alveoli}}{V_{alveoli}} \times Cl_{23} \right) - (X_{retention} \times k_{32}) \quad (49)$$

avec $X_{retention}$ la quantité dans le compartiment de rétention.

Le modèle spécifique pour la céphapirine représente également une absorption systémique à partir de l'alvéole par une clairance de premier ordre (Cl_{20}) (pas nécessaire pour les autres molécules). En effet il a été montré que certains antibiotiques étaient absorbés au niveau systémique à partir de la glande (Ziv and Sulman, 1975). Étant donné que l'alvéole est la plus grande surface de la glande, et est très vascularisée, toute l'absorption systémique est considérée à partir de ce compartiment. Les phénomènes d'absorption systémique à partir de la citerne et de redistribution du systémique vers la glande ont été considérés négligeables.

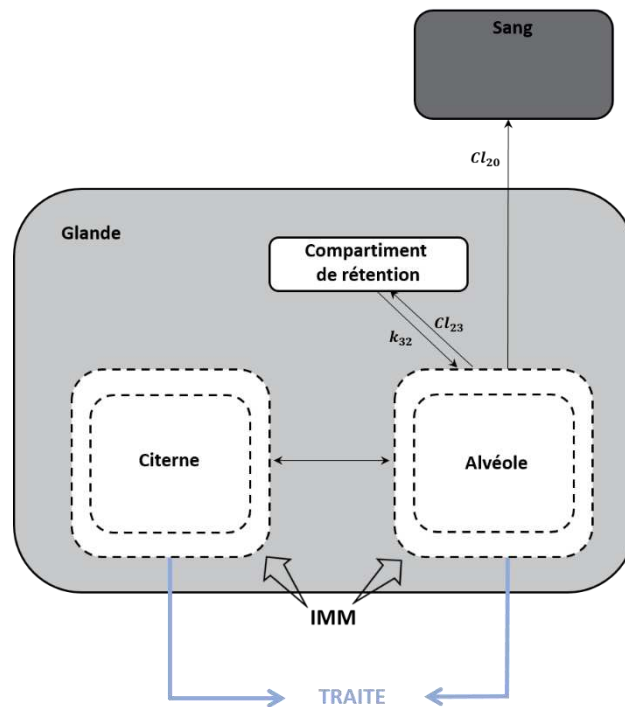


Figure 13: Modèle PBPK de l'administration IMM de trois bêta-lactames chez la vache développé par Woodward. Adapté de (Woodward and Whitem, 2019).

Les paramètres du modèle ont été estimés par une approche « *middle out* » (mélange de paramètres physiologiques *a priori* et d'estimation de paramètres pharmacocinétiques) (Tsamandouras, Rostami-Hodjegan and Aarons, 2015) en plusieurs étapes. Les paramètres physiologiques (Eq. 46 et 47) ont été estimés par une méthode non linéaire à effet mixte sur des données externes de volumes de lait, puis (après avoir fixé les ALV_{50} et CIS_{delay}) les autres paramètres du modèle ont été estimés par une régression non-linéaire (implémentée dans MATLAB®) pour chaque molécule.

L'analyse de sensibilité locale montre que le ALV_{max} , le CIS_{rate} et le volume résiduel ont une influence sur les prédictions du modèle.

Pour conclure, le modèle de Woodward *et al* permet de prédire la distribution dans la glande de 3 BL après une administration IMM, en décrivant plus précisément la physiologie de la glande et la sécrétion du lait et en incorporant une réabsorption systémique. L'ajout d'un compartiment de rétention mimant une adsorption des BL à l'épithélium alvéolaire était nécessaire pour améliorer le modèle, cependant ce phénomène ne provient pas d'un phénomène physiologique connu. Ce compartiment se confond avec celui du volume résiduel pour retenir les BL dans la

glande. Enfin, le modèle ne considère pas le transport actif ni la composition du lait et la fixation des BL aux différents composants du lait. De plus, l'ionisation des molécules dans le plasma ou le lait n'est pas prise en compte dans le modèle.

Plus récemment, les auteurs ont extrapolé ce modèle à l'excrétion de la pirlimycine dans le lait des vaches atteintes (ou non) de mammite après administrations IMM et IV (Woodward, Morin and Whittem, 2020) (voir Figure 14). Les principaux changements du modèle concernent la simplification du lait en un compartiment unique (lait), le volume de lait qui n'est plus représenté par un modèle mais par une valeur expérimentale mesurée à chaque traite (quand les données sont disponibles) et l'ajout de l'excrétion de pirlimycine du compartiment systémique vers le lait (caractérisé par k_{42}). Grâce à l'approche de la modélisation non-linéaire à effet mixte (NLME), ils ont étudié le rôle de covariables (telles que la présence de mammite, le nombre de quartiers atteints et le type de bactéries Gram⁺ ou Gram⁻) et différencient les effets fixes, les effets aléatoires (IIV) et l'erreur résiduelle. Quelques paramètres ont été estimés en fonction des covariables, tels que le volume résiduel (en fonction des quartiers infectés), et les constantes de vitesses entre le compartiment de rétention et le lait (k_{32} , k_{23} , en fonction la présence de mammite) ; entre le lait et le compartiment central (k_{24} , en fonction du type de bactérie). Le modèle prédit correctement (surestime pour certains individus) les résidus de pirlimycine dans le lait, avec une biodisponibilité systémique de 50% après administration IMM (contrairement aux BL du modèle précédent). Le compartiment de rétention est essentiel pour prédire les concentrations de pirlimycine dans le lait. Au niveau des covariables, la présence de Gram⁺ augmente l'absorption systémique (k_{24}) et le nombre de quartier infectés influence positivement V_{residual} (et donc une plus grande rétention de pirlimycine). Ces effets sont estimés par le modèle et non à partir de données physiologiques, néanmoins ils apportent des informations sur l'importance de l'état pathologique des animaux et l'influence sur la PK des xénobiotiques dans le lait.

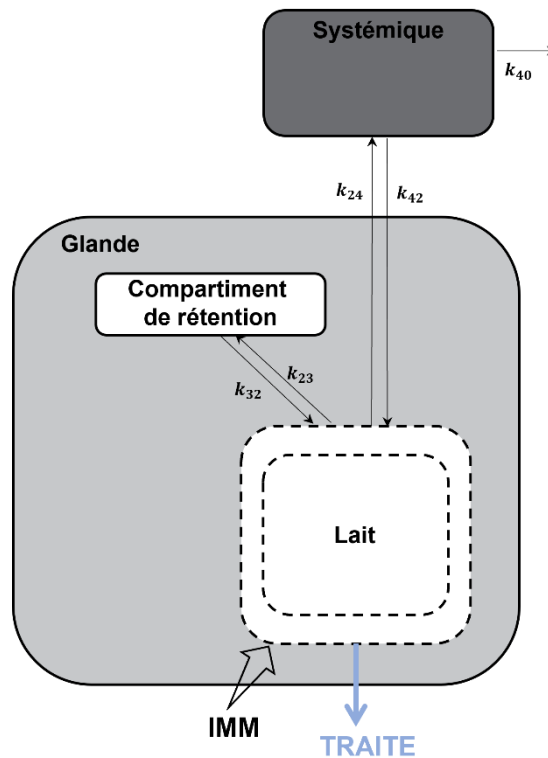


Figure 14: Modèle PBPK de l'administration IMM et IV de pirlimycine chez la vache développé par Woodward. Adapté de (Woodward, Morin and Whitem, 2020).

❖ Médecine humaine

Quelques modèles PBPK évaluant l'excrétion de xénobiotiques dans le lait sont disponibles en médecine humaine (Redding *et al.*, 2008; Loccisano *et al.*, 2013; Komprda *et al.*, 2019; Abduljalil *et al.*, 2021; Yeung *et al.*, 2021). La récente revue de Nauwelaerts *et al* (Nauwelaerts *et al.*, 2021) en cite quelques-uns. Le modèle de Abduljalil *et al* (2021) sera pris en exemple dans ce paragraphe.

Le modèle de **Abduljalil** *et al* (2021) intègre la prédiction du ratio M/P dans un modèle PBPK afin de prédire l'excrétion lactée de plusieurs molécules avec différentes caractéristiques physico-chimiques (paracétamol, alprazolam, caféine et digoxine) (Abduljalil *et al.*, 2021). Le volume de lait a été fixé à 150 mL par jour (prise de lait quotidienne par le nouveau-né) afin d'estimer la dose ingérée par l'enfant. Le modèle prend en compte l'ionisation des molécules (dans le plasma et le lait), leur diffusion passive dans le lait et leur partage entre la MG et la

phase aqueuse du lait. Il se base sur les équations de modèles *in silico* de passage dans le lait détaillés précédemment (voir section 1.4.3.4) (Atkinson and Begg, 1990; Fleishaker, 2003).

L'ionisation dans le lait (f_m^{union}) et dans le sang (f_p^{union}) est prise en compte pour une base grâce à Eq. 3 (voir section 1.4.3.4) :

$$\frac{f_m^{union}}{f_p^{union}} = \frac{1 + 10^{(pKa-pH_{milk})}}{1 + 10^{(pKa-pH_p)}}$$

La fixation dans le lait écrémé (*skim milk*) est calculée grâce à Eq. 5 (voir section 1.4.3.4) :

$$fu_{skim,milk} = \frac{fu_p^{0,448}}{(6,94 \times 10^{-4})^{0,448} + fu_p^{0,448}}$$

La fixation au lait entier est calculée grâce à Eq. 15 (voir section 1.4.3.4) :

$$fu_{whole,milk} = \frac{1}{A} = \frac{1}{\frac{0,955}{fu_{skim,milk}} + 0,045 \times k_{lipides}}$$

Et enfin, le ratio M/P est calculé à partir des équations de Begg *et al* (Begg and Atkinson, 1993) (Eq.50 51) :

$$\frac{M}{P} = \frac{fu_p \times f_p^{union}}{f_m^{union}} \times \frac{1}{fu_{whole,milk} \times \frac{S}{W}} \quad (50)$$

$$\frac{S}{W} = \frac{1}{1 + Crt \times (fu_{whole,milk} \times LogP - 1)} \quad (51)$$

avec S/W la distribution entre le lait écrémé (S) et le lait total (W) ; Crt la crématocrite.

Et la concentration d'une molécule dans le lait peut être estimée à partir de la concentration plasmatique (C_{plasma}) et du ratio M/P (Eq. 52)

$$C_{milk} = C_{plasma} \times M/P \quad (52)$$

Ce modèle fait donc l'hypothèse que les concentrations dans le lait et le plasma sont parallèles, et qu'il n'y a pas de décalage temporel entre les deux profils. Globalement, ce modèle se base sur les équations déjà existantes, qui prennent en compte l'ionisation et la répartition des molécules entre la MG et la phase aqueuse du lait mais ne détaillent pas la physiologie de la glande mammaire, la sécrétion du lait ni la dynamique du volume de lait. Le transport actif n'est pas non plus pris en compte.

Pour conclure, les modèles PBPK ont un avantage majeur : ils permettent d'incorporer la majorité des connaissances existantes (*in vitro*, *in vivo*, *in silico*, *QSAR*) des mécanismes d'excrétion dans le lait. Ils peuvent également être améliorés au fur et à mesure que de nouvelles connaissances sont acquises. Grâce à ces modèles PBPK, il est également possible de prendre en compte la physiologie (ou pathologie) de l'organisme, qui peut influencer le passage et/ou la persistance des résidus de xénobiotiques dans le lait.

3. Méthode de dosage des résidus dans le lait

En médecine vétérinaire, la surveillance des résidus de médicaments dans les denrées d'origine animale telles que le lait est réglementée par une directive européenne (Directive 96/23, 1996) (Laurentie, Creff-Froger and Gaudin, 2002). L'identification et la quantification de la ou des substances actives résiduelles se fait grâce à une méthode de dosage, principalement en HPLC ou en LC-MS/MS, qui doit être spécifique, précise et juste.

3.1. Principe d'une méthode de dosage en HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique de séparation, d'identification et de quantification des constituants d'un mélange sur la base de leurs propriétés physico-chimiques (voir Figure 15) (Bird, 1989; Nikolin *et al.*, 2004; Blum, 2014). Pour rappeler brièvement le principe de la HPLC, une **phase mobile** (choisie en lien avec les propriétés des constituants à séparer) parcourt une **phase stationnaire** (ou colonne) et élue les uns après les autres les constituants du mélange, injecté à l'entrée de la colonne. En fonction du choix de la colonne, les constituants, inégalement retenus lors de la traversée de la colonne (suivant leur affinité avec la phase stationnaire), seront identifiés par leur différents **temps de rétention** (TR) au sein de la colonne. A la sortie de la colonne, un détecteur est couplé à un système d'analyse de données qui transforme le signal électrique émis en réponse numérique telle qu'un **chromatogramme**. Sur le chromatogramme, par exemple, une ligne de base est enregistrée lors du passage de la phase mobile seule, tandis qu'un pic apparaîtra au passage de chaque constituant séparé. L'aire du pic permet alors de déterminer la concentration du composé dans le mélange.

Les détecteurs utilisés en HPLC sont nombreux. Parmi eux, la spectroscopie ultraviolette (UV), la fluorescence (Fluo) et la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) seront expliqués dans le paragraphe ci-dessous.

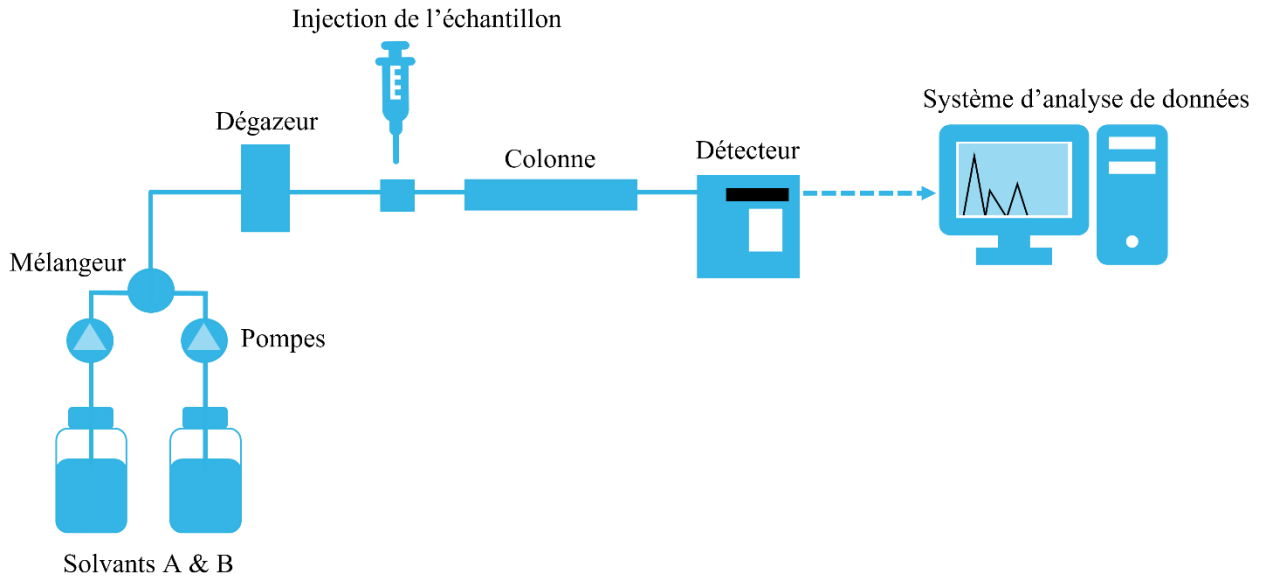


Figure 15: Principe de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les solvants A et B constituent la phase mobile et sont injectés dans le système grâce aux pompes. Le mélangeur permet d'obtenir la proportion choisie de chaque solvant. La phase mobile passe par un dégazeur qui chasse l'oxygène dissous, puis traverse la colonne. L'échantillon à analyser est injecté à l'entrée de la colonne. Le détecteur est couplé à un système d'analyse de données qui rend une réponse numérique telle qu'un chromatogramme.

3.1.1. Détecteur UV

Le **détecteur UV** mesure l'absorption de la lumière ultra-violette par le composé à la sortie de la colonne. Le détecteur UV nécessite que le composé à identifier absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible (entre 190 et 350 nm) et que son coefficient d'absorption de la lumière soit assez grand pour être détecté. Il exige également d'utiliser une phase mobile n'absorbant pas la lumière à la longueur d'onde choisie. Néanmoins, ce mode de détection offre une excellente reproductibilité et des analyses quantitatives rapides (Nikolin *et al.*, 2004).

3.1.2. Détecteur de fluorescence

Le **détecteur de fluorescence** mesure l'émission d'un signal lumineux (fluorescence) des atomes du composé d'intérêt, excités par une longueur d'onde définie. L'intensité de la lumière émise permet de déterminer la concentration du composé. Les avantages du détecteur de fluorescence sont sa grande sensibilité et sa sélectivité pour de nombreux groupes de

composés (Nikolin *et al.*, 2004). Il est également facile à utiliser et relativement stable. Il faut cependant bien connaître les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation du composé.

3.1.3. Spectromètre de masse en tandem

Le **spectromètre de masse en tandem** (MS/MS) permet de quantifier les molécules à partir de leur PM (voir Figure 16) (Kang, 2012). Plusieurs étapes sont nécessaires : (i) **une étape d'ionisation** permet de transformer l'échantillon injecté en un faisceau d'ions gazeux (de nature $[M+nH]^{n+}$). Il existe de nombreuses sources d'ionisation API (atmospheric pressure ionisation) telles que l'ESI, APCI, APPI, MALDI. (ii) **Une étape de séparation** : les ions produits passent dans l'analyseur de masse (MS) et sont soumis à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique permettant la détermination de leur rapport masse sur charge (m/z) qui permet ensuite leur tri. Il existe plusieurs analyseurs tels que le quadripole, le triple quadripole, l'Orbitrap® (l'analyseur à trappe ionique) et le TOF® (time of flight). (iii) **Une étape de fragmentation** : les « ions parents » sont fragmentés dans l'analyseur en « ions fils » par l'intermédiaire d'un gaz de collision tel que l'argon. (iv) **Une seconde étape de séparation** : les ions fils d'intérêt sont triés grâce à leur rapport m/z prédéfinis dans la méthode d'acquisition réalisée par l'opérateur. (v) **Une étape de détection** : les ions fils sélectionnés traversent l'analyseur de masse un par un (suivant leur rapport m/z) pour atteindre le détecteur, et être convertis en un signal électrique puis en une réponse numérique.

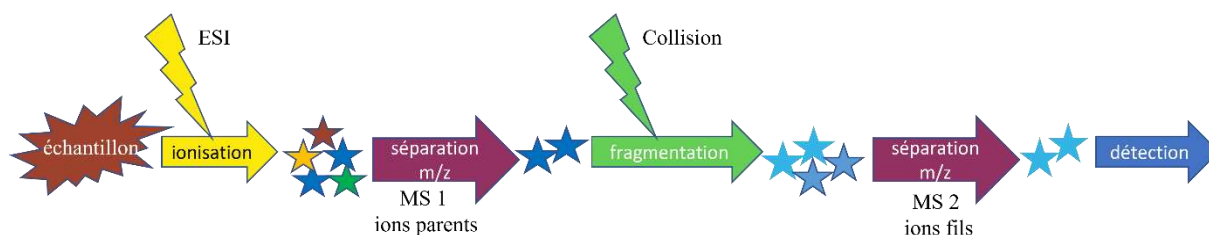


Figure 16: Principe du spectromètre de masse en tandem (MS/MS). Voir texte.
Schéma adapté de (Kang, 2012).

La spectrométrie de masse est une méthode très utilisée. Elle permet d'analyser une large gamme de composés avec des capacités minimales de détection allant de la picomole à la zeptomole (10^{-21} mole). Contrairement aux autres techniques qui s'appuient sur les caractéristiques indirectes de l'analyte (telles que son absorption de la lumière), la MS/MS permet de détecter un composé directement à partir de son PM. Cependant, la sélectivité de

cette méthode peut être remise en cause par des interférences liées à la matrice ou à des métabolites qui entraînent une suppression ou une augmentation des ions. Dans ce cas, il est possible d'utiliser un étalon interne (IS, un analogue structurel ou un isotope marqué), introduit en concentration constante dans l'échantillon à analyser pour vérifier l'absence de problème survenu dans la cellule d'ionisation (par exemple, problème lors de l'ionisation ou la fragmentation).

3.2. Validation d'une méthode de dosage

La validation d'une méthode analytique est une procédure qui permet de démontrer, par des résultats expérimentaux, que les critères évalués sont validés (répondent aux exigences d'une guideline telle que le VICH topic GL49 ou l'EMA).

Plusieurs approches permettent de valider une méthode de dosage (voir Figure 17). La méthode classique se base sur la validation de **caractéristiques de performance** définies aux préalables, telles que la justesse et la fidélité, qui sont validées indépendamment. Une méthode alternative permet de combiner ces caractéristiques (justesse et fidélité) en une seule caractéristique, l'exactitude. Cette approche, basée sur l'utilisation du **profil d'exactitude**, permet également de mieux maîtriser le risque d'avoir des résultats non valides lors de l'utilisation de la méthode en routine (Armand, 2015).

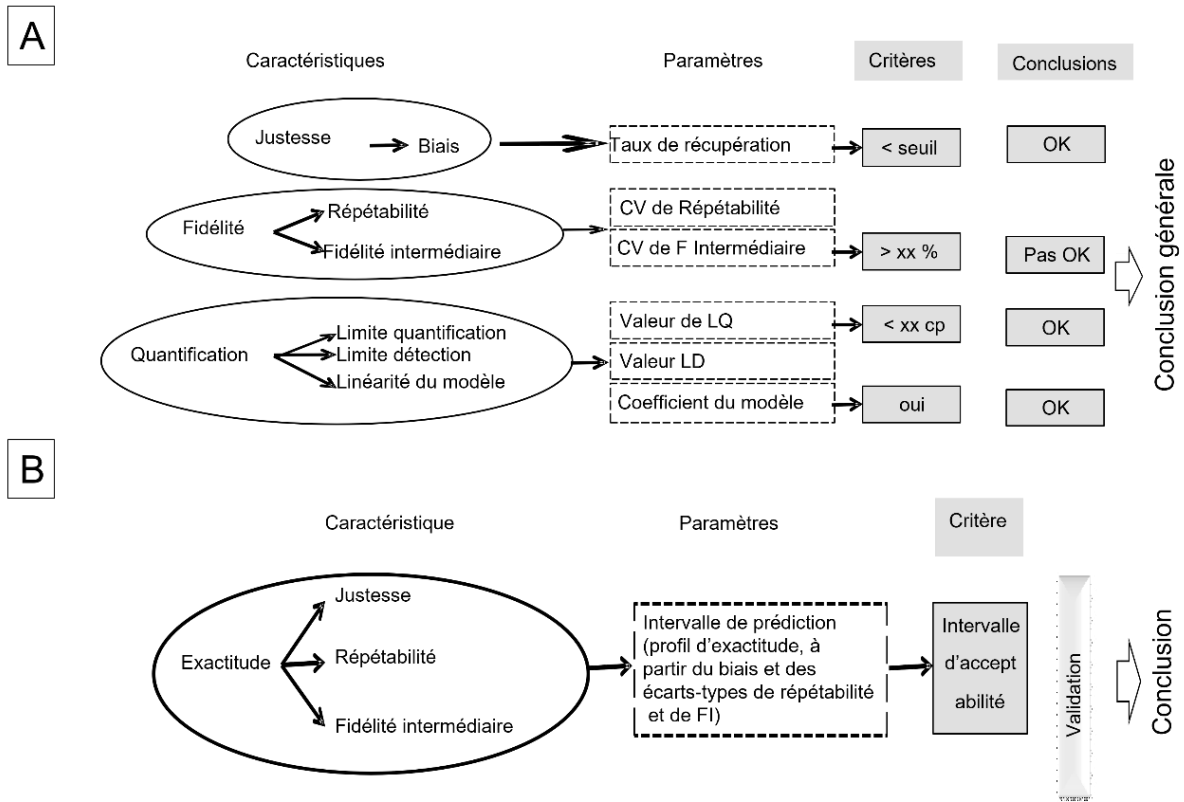


Figure 17: Illustration de la méthodologie de caractérisation des caractéristiques de performance (A) étudiées séparément ou (B) basée sur un critère unique.

3.2.1. Approche classique

L'approche classique est la plus souvent utilisée. Les critères de performance imposés pour valider la méthode sont nombreux : justesse, fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité), linéarité, fonction de réponse, limites de détection et de quantification, range de concentrations, sélectivité (Hubert *et al.*, 2004). D'autres critères plus spécifiques, tels que la stabilité, le rendement, l'effet de dilution, l'effet mémoire, l'effet matrice, peuvent s'ajouter en fonction de l'utilisation de la méthode.

Les définitions de certains de ces termes sont controversées et diffèrent selon les organismes (ICH, SFSTP, COFRAC, ISO, AFNOR...). Elles sont rappelées ici, suivant la commission de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) (Boulanger *et al.*, 2003).

(i) la **justesse** (*trueness* en anglais) est une caractéristique non chiffrée (vraie valeur inconnue) qui exprime l'étroitesse de l'accord entre une moyenne de valeurs expérimentales et

une valeur de référence acceptée. Cette caractéristique peut être estimée par un paramètre : le biais relatif (Eq.53) et est mesurée à chaque niveau de concentration de la gamme.

$$\text{Biais relatif (\%)} = \frac{C_{\text{obs}} - C_{\text{théorique}}}{C_{\text{théorique}}} \times 100 \quad (53)$$

(ii) la **fidélité** (*precision* en anglais) est une caractéristique non chiffrée qui exprime la capacité d'une méthode à fournir un résultat avec une dispersion la plus faible possible entre une série de mesures provenant de répliquats d'un même échantillon. Elle est généralement exprimée par un écart-type (SD) ou un coefficient de variation (CV%) (Eq.54). La fidélité se divise en 3 sources de dispersion : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité (voir Figure 18). La répétabilité est définie comme la réalisation d'une analyse sur un même équipement, un même opérateur et un même laboratoire (pendant une période courte) ; la fidélité intermédiaire représente la réalisation d'analyse dans le même laboratoire, mais sur différents jours et des opérateurs différents (essais intra-laboratoire) ; la reproductibilité représente la réalisation d'analyse dans un autre laboratoire, par différents opérateurs et sur différents équipements (essais inter-laboratoires).

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{Ecart type}}{\text{Moyenne}} \times 100 \quad (54)$$

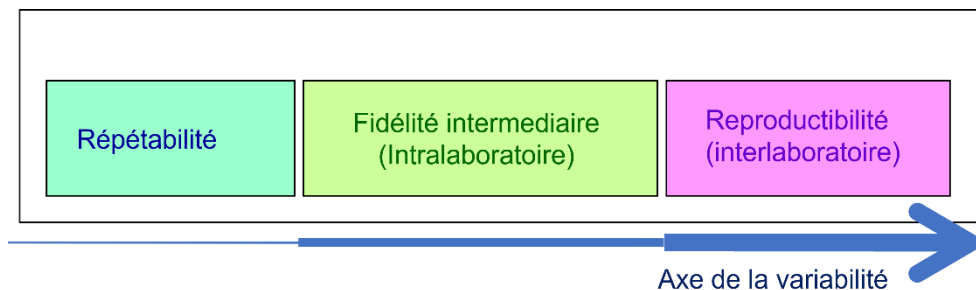


Figure 18: Composantes croissantes de la variabilité : répétabilité, fidélité intermédiaire et reproductibilité.

(iii) L'**exactitude** (*accuracy* en anglais) est une caractéristique non chiffrée. Elle est estimée par la somme de la justesse et de la fidélité, c'est-à-dire l'erreur totale (voir Figure 19). Elle peut être mesurée par le profil d'exactitude (voir section 3.2.2). L'exactitude est encore parfois confondue à tort avec la justesse.

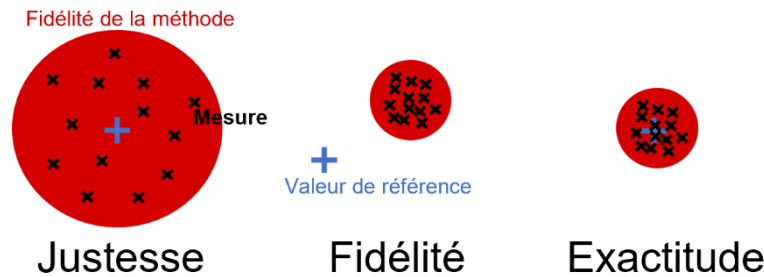


Figure 19: Représentation schématique d'une méthode de dosage juste mais pas fidèle (à gauche), fidèle mais pas juste (au milieu) ou exacte (juste et fidèle, à droite) en fonction de la distribution des essais.

(iv) la **fonction de réponse** est la capacité d'une méthode à obtenir des réponses liées à la concentration. Plusieurs modèles mathématiques sont testés et le modèle le plus simple remplissant les critères de justesse et de fidélité est choisi. La fonction de réponse n'est pas toujours linéaire.

(iv) **La linéarité** est la capacité d'une méthode à obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration.

(v) la **sélectivité** permet de s'assurer qu'aucun analyte n'interfère avec le composé d'intérêt et est évaluée en comparant des échantillons blancs (plusieurs lots de matrice) et des échantillons supplémentés au premier point de gamme (limite inférieure de quantification : LLOQ) de l'analyte d'intérêt.

(vi) l'**effet mémoire** (*carry over* en anglais) permet de vérifier qu'aucune contamination n'a lieu d'une injection à une autre et est évalué en injectant un échantillon supplémenté au point de gamme le plus élevé (ULOQ) suivi de deux échantillons témoins (sans le composé d'intérêt).

(vii) l'**effet matrice** consiste à évaluer l'applicabilité de la méthode à des matrices (ensemble des constituants de l'échantillon) de différentes origines et est évalué en injectant des matrices supplémentées (avec le composé d'intérêt) ainsi que des solutions standards (std, avec le composé d'intérêt mais sans matrice). L'effet matrice est calculé par le ratio de l'aire du supplémenté sur l'aire du std, avec ou sans étalon interne.

Dans l'approche classique, tous les critères sont évalués indépendamment (critère par critère). Ce type de validation définit comme une bonne méthode de dosage celle qui permet l'estimation la plus fine de la fidélité et de la justesse (et des autres critères) sur la gamme de concentrations dosées.

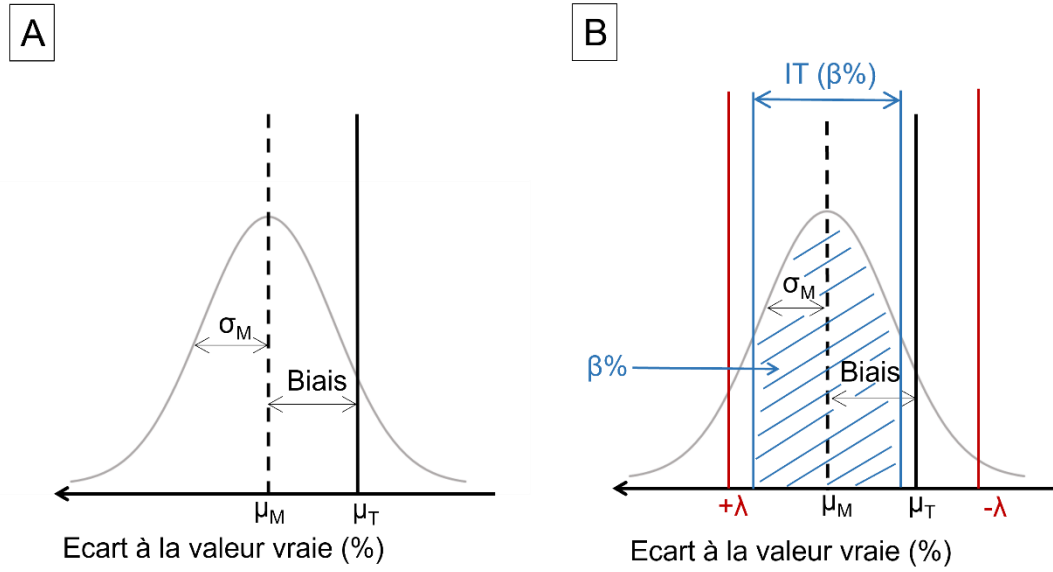
3.2.2. Profil d'exactitude

L'approche globale, plus récente, est basée sur l'**erreur totale** (erreur systématique liée à la justesse + erreur aléatoire liée à la fidélité) et permet la construction du profil d'exactitude. Elle permet de décider de la capacité d'une méthode à fournir des résultats dans le domaine de validation lié aux exigences professionnelles (par exemple 15% de biais en bioanalyse suite à la convention de Washington).

En pratique, le profil d'exactitude se base sur la construction d'un **intervalle de tolérance** ou de dispersion (IT), utilisant les estimations du biais (justesse) et de la variance (fidélité intermédiaire et répétabilité) pour chaque niveau de concentration étudié dans la méthode, et la vérification que cet intervalle est contenu dans les **limites d'acceptabilité** fixées ($-\lambda$ / $+\lambda$).

Pour construire l'IT, la proportion ($1 - \beta$), correspondant au pourcentage de mesures qui seront en dehors de l'intervalle de tolérance, est fixée. Par exemple, avec un β à 80%, un résultat sur cinq risque d'être en dehors de l'intervalle de tolérance. Ainsi, le risque associé à l'utilisation de la méthode dans les analyses de routine est maîtrisé.

La méthode de dosage validée est celle dont l'IT (Eq. 55) est compris entre $-\lambda$ et $+\lambda$ et contient $\beta\%$ des résultats de dosage (voir Figure 20).



$$\beta TI = \left[\begin{array}{l} \text{biais}(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \times \sqrt{1 + \frac{1}{p \times n \times B_j^2}} RSD_{IP,j} ; \\ \text{biais}(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \times \sqrt{1 + \frac{1}{p \times n \times B_j^2}} RSD_{IP,j} \end{array} \right] \quad (55)$$

avec $\text{biais}(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j - \hat{\mu}_{Tj}}{\hat{\mu}_{Tj}} \times 100$; $RSD_{IP,j} = \frac{\hat{\sigma}_{IP,j}}{\hat{\mu}_j} \times 100$; $B_j = \sqrt{\frac{r_j + 1}{n \times r_j + 1}}$, $r_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{W,j}^2}$

où p est le nombre de séries (1 série par jour), n est le nombre de réplicats par série (et par niveau de concentration), $\hat{\mu}_j$ est l'estimation de la moyenne des résultats du $j^{\text{ème}}$ niveau de concentration, $\hat{\mu}_{Tj}$ est la moyenne théorique du $j^{\text{ème}}$ niveau de concentration, $\hat{\sigma}_{IP,j}$ est l'estimation de la variance de la fidélité intermédiaire au $j^{\text{ème}}$ niveau de concentration, qui est la somme de la variance intra-série ($\hat{\sigma}_{W,j}^2$), et de la variance inter-série ($\hat{\sigma}_{B,j}^2$), $Q_t \times \left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$ est le quantile β de la distribution t de Student avec v degrés de liberté estimé par $\frac{(r+1)^2}{\frac{(r+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}}$.

Pour obtenir le profil d'exactitude, le biais relatif calculé pour chaque niveau de concentration est tracé en fonction de la concentration et les limites inférieures et supérieures

de tolérance de chaque niveau de concentration sont reliées entre elles, respectivement. Les limites d'acceptation sont également reportées sur le graphique (voir Figure 21). Si le profil est inclus dans les limites d'acceptabilité, la méthode est considérée comme valide sur toute la gamme de concentration étudiée. En revanche, si le profil sort des limites, la méthode n'est pas considérée valide pour ces niveaux de concentration. Il est alors possible de rejeter la méthode ou d'adapter le range de concentration (augmenter la L_{LOQ} par exemple).

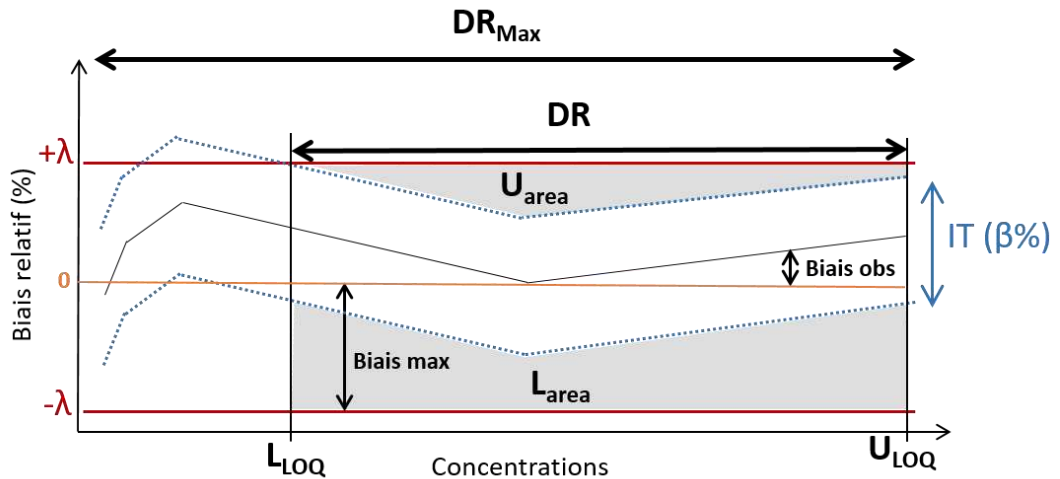


Figure 21: Représentation schématique d'un profil d'exactitude et des indices associés. Voir la définition des abréviations dans le texte.

Adapté de (Rozet et al., 2007).

Les différents profils d'exactitude établis (pour différentes fonctions de réponse) sont évalués suivant quatre **indices** basés sur la justesse (I_T , Eq.56), la fidélité (I_P , Eq.57), le range de concentration (I_{DR} , Eq.58) et l'exactitude (I_A , Eq.59) (Rozet *et al.*, 2007) (voir Figure 21). L'indice d'exactitude est la moyenne géométrique des trois autres indices.

$$I_T = \frac{SSB_{Max} - SSB_{Obs}}{SSB_{Max}} \quad (56)$$

$$I_P = \frac{U_{Area} + L_{Area}}{AREA_{Max}} \quad (57)$$

$$I_{DR} = \frac{U_{LOQ} - L_{LOQ}}{DR_{Max}} \quad (58)$$

$$I_A = \sqrt[3]{I_T \times I_{DR} \times I_P} \quad (59)$$

où SSB_{Max} est la somme des carrés des biais maximaux (λ) à chaque niveau de concentration étudié par les standards de validation inclus dans la gamme de dosage, SSB_{Obs} est la somme des carrés des biais moyens observés à chaque niveau de concentration également inclus dans la

gamme de dosage, U_{Area} est la surface de la zone comprise entre (i) les limites supérieures de tolérance β et les limites supérieures d'acceptation $+\lambda$ et (ii) située entre la LLOQ et la limite ULOQ, L_{Area} est la surface de la zone comprise entre (i) les limites inférieures de tolérance β et les limites inférieures d'acceptation $-\lambda$ et (ii) située entre la LLOQ et la ULOQ, $AREA_{Max}$ est la surface de la zone définie par les limites supérieures et inférieures d'acceptation $\pm\lambda$ et la LLOQ et la ULOQ, DR_{Max} est la différence entre les niveaux de concentration les plus élevés et les plus bas étudiés pendant la validation.

Pour résumer, lorsque l'indice I_{DR} est égal à 1, cela signifie que la méthode est valable sur la totalité de l'intervalle de concentration étudié. Lorsqu'il est inférieur à 1, la méthode n'est validée que sur une partie réduite de l'intervalle. Plus les indices I_T et I_P sont proches de 1, plus la méthode est juste et fidèle, respectivement. L'indice I_A représente l'estimation de l'erreur totale de la méthode. Elle montre la qualité globale de la méthode sur l'intervalle de concentration étudié. Le profil d'exactitude (et la fonction de réponse associée) choisi sera celui qui possèdera l' I_A le plus élevé, ou celui avec un I_{DR} de 1 si l'objectif de la méthode est de valider tout le range de concentration étudié. La réglementation suggère aussi de choisir la fonction de réponse la plus simple (principe de parcimonie) (Hubert *et al.*, 2007).

❖ Mesure de l'incertitude

Avant de choisir une méthode d'analyse, il faut être conscient du niveau d'incertitude de la méthode, en fonction de son utilisation en routine. Grâce au profil d'exactitude, il est possible d'estimer l'incertitude associée à la méthode (Henri *et al.*, 2017).

L'incertitude étendue relative (REU pour *relative extended uncertainty*) est basée sur la variabilité du biais relatif, la variance de la fidélité intermédiaire et un facteur de recouvrement ($k=2$) (Eq 60, 61, 62). Elle permet de construire un intervalle de confiance à 95% autour de chaque valeur mesurée.

$$\text{Incertainitude} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 \times \left(1 + \frac{1}{p \times n \times B^2}\right)} \quad (60)$$

$$\text{Incertainitude}_{relative} = \frac{\text{Incertainitude}}{\bar{\mu}} \times 100 \quad (61)$$

$$\text{Incertainitude}_{étendue,relative} = REU = 2 \times \text{Incertainitude}_{relative} \quad (62)$$

$$\text{avec } B_j = \sqrt{\frac{r_j + 1}{n \times r_j + 1}} \text{ et } r_j = \frac{\hat{\sigma}_{Bj}^2}{\hat{\sigma}_{Wj}^2}$$

où μ est la concentration moyenne introduite, n est le nombre de répétitions par série et p est le nombre de séries, $\hat{\sigma}_{IP}^2$ est l'estimation de la variance de la fidélité intermédiaire, qui est la somme de la variance intra-série ($\hat{\sigma}_W^2$), et de la variance inter-série ($\hat{\sigma}_B^2$),

La REU est estimée pour chaque niveau de concentration. Elle est ensuite exprimée en fonction de la concentration (Thompson, 2011) et permet d'établir une **fonction d'incertitude**, parmi plusieurs fonctions mathématiques testées (celle avec le meilleur R^2 sera choisie). Cette fonction d'incertitude permet d'attribuer une incertitude à toute concentration située dans l'intervalle de concentrations validé dans les conditions données : cela permet **d'interpoler** l'incertitude d'une future concentration. Cette fonction permet également de spécifier une incertitude maximale admissible ou de choisir parmi plusieurs profils d'exactitude (Rudaz and Feinberg, 2018).

Pour conclure, l'approche globale permet d'accepter ou non une méthode de dosage pour une application donnée, puisque les limites d'acceptabilité sont fixées en fonction de la finalité de la méthode. Elle garantit (avec un certain niveau de confiance) qu'une proportion fixée des futures mesures des QC sera dans l'IT. L'approche globale permet également de situer les points critiques de la méthode et de mieux maîtriser les risques. Même si les conclusions peuvent parfois être opposées à celles d'une approche classique (voir Figure 22), la méthode globale permet de conclure plus facilement sur la validité de la méthode (Feinberg, 2007; Gaudin, 2016).

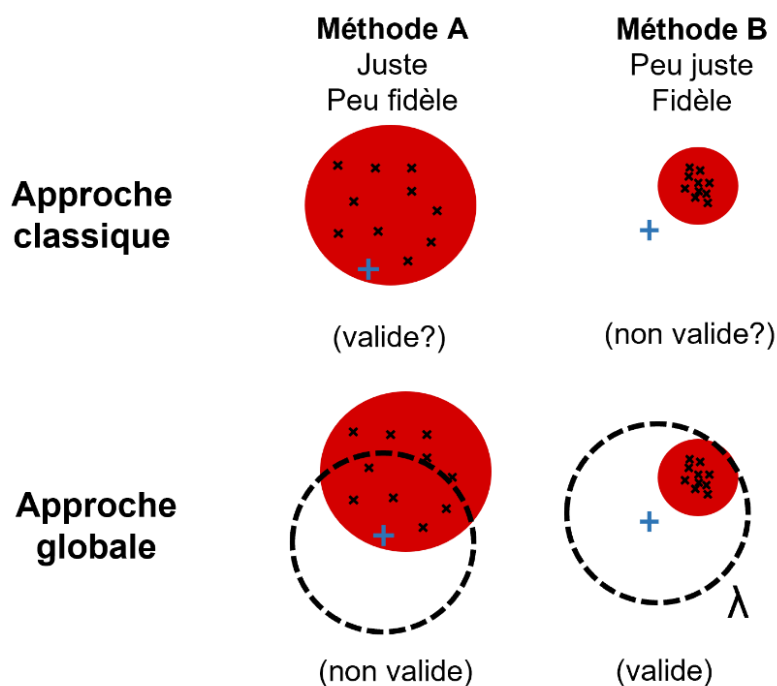


Figure 22: Comparaison de la validation de méthodes analytiques par une approche classique et une approche globale. La méthode A est juste mais peu fidèle, la méthode B est fidèle mais peu juste, la conclusion sur la validité de la méthode est difficile en suivant l'approche classique (en haut) et facilitée en suivant l'approche globale (en bas) en regardant les limites d'acceptabilité (cercle pointillé noir).

4. Objectifs de la thèse

La problématique du passage de xénobiotique à travers la barrière sang-lait est commune à la médecine humaine et la médecine vétérinaire. Pour évaluer l'importance de leur passage dans le lait, il est nécessaire de bien caractériser la PK des différentes molécules, les mécanismes impliqués dans leur passage et leur rétention dans le lait, ainsi que les différences entre les espèces productrices de lait. Ce qui amène à détailler les différents objectifs de cette thèse (voir Figure 23).

A. Validation d'une méthode de dosage grâce à l'approche globale et quantification des résidus d'un antibiotique dans le lait de trois espèces.

La première étape dans l'évaluation des xénobiotiques dans le lait est leur quantification précise grâce à une méthode de dosage robuste et sensible. Une approche globale, utilisant le profil d'exactitude, a été utilisée pour valider une méthode de dosage de la spiramycine et de son métabolite actif la néospiramycine dans le lait de chèvre, de vache et de brebis. Cette approche a permis de simplifier les dosages en routine de ces molécules dans les trois laits en utilisant uniquement des standards de validation dans le lait le plus accessible (le lait de vache).

B. Le développement d'un modèle PBPK générique et application au passage d'un antibiotique dans le lait de deux espèces.

Les modèles PBPK peuvent détailler les processus d'ADME et à partir des propriétés physico-chimiques des molécules, tout en tenant compte les caractéristiques physiologiques de l'espèce cible. Ce sont des outils très utiles pour prédire le profil cinétique de médicaments vétérinaires dans le lait. Développer un modèle PBPK générique avec une structure pouvant être ajustée pour des extrapolations inter-espèces et inter-molécules est un des objectifs principaux de la thèse. Ce modèle a été appliqué pour prédire le passage de l'oxytétracycline dans le lait de vache et de chèvre. Il est basé sur la physiologie des espèces et plus précisément de la glande mammaire, la composition et la production du lait ainsi que l'ionisation de la

molécule dans le sang et le lait, sa fixation aux composants tissulaires de la glande et aux différents composants du lait et sa distribution dans la MG et la phase aqueuse du lait.

C. Comparaison du passage de quatre antibiotiques dans le lait de trois espèces

La nature de la molécule influence grandement son passage dans le lait : une petite molécule lipophile et non-ionisée traverse facilement les membranes cellulaires et peut passer dans le lait. Quatre antibiotiques aux propriétés distinctes : amoxicilline, marbofloxacin, oxytétracycline et spiramycine, ont été administrés à des vaches, chèvres et brebis laitières. Au préalable d'une future application du modèle PBPK à ces molécules, des analyses non-compartimentales ont permis d'estimer des paramètres cinétiques dans le lait et le plasma et de les comparer en fonction des molécules et des espèces.

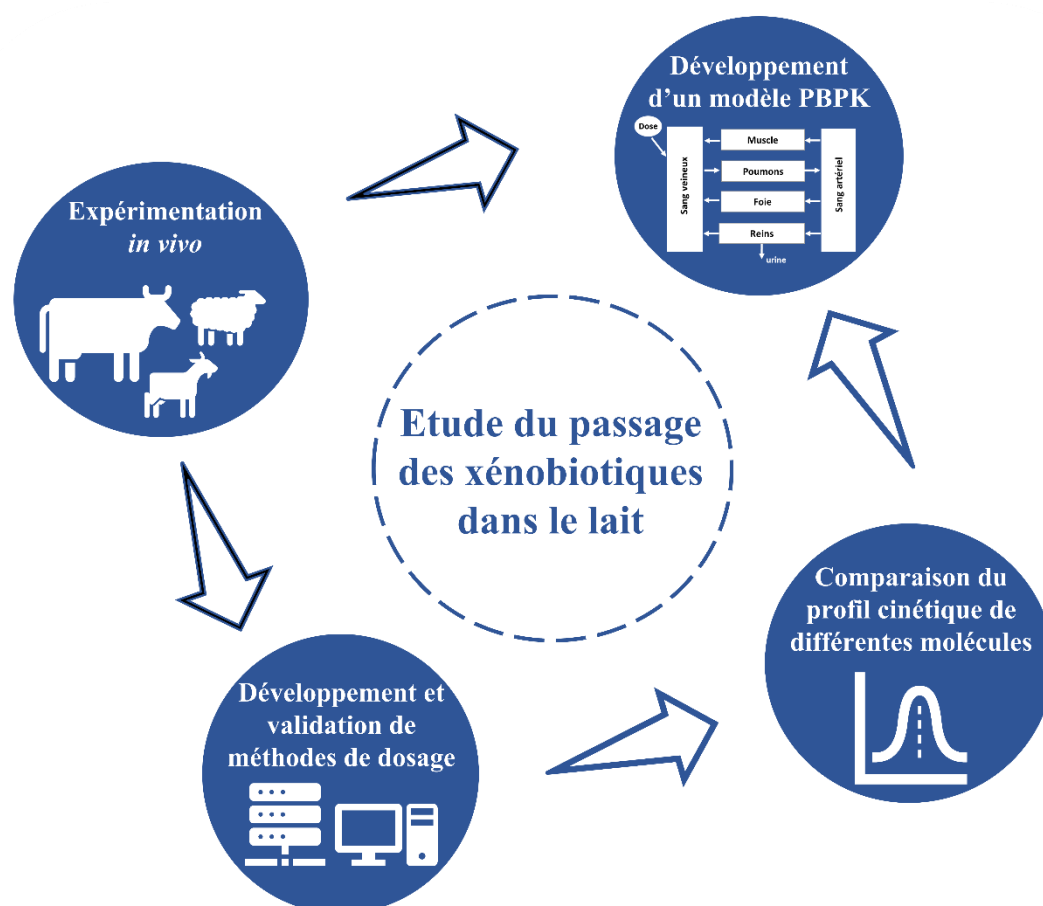


Figure 23: Objectifs de la thèse.

Deuxième Partie : Travaux de recherche

5. Travail expérimental

5.1. Validation d'une méthode de dosage grâce à la méthode globale et quantification des résidus d'un antibiotique et son métabolite dans le lait de trois espèces de production

5.1.1. Introduction

Le passage de nombreux xénobiotiques dans le lait est bien connu dans le secteur de la santé. En médecine vétérinaire, la surveillance des résidus de médicaments est réglementée par une directive européenne (Directive 96/23, 1996) et se déroule en deux étapes : le dépistage et la confirmation (Laurentie, Creff-Froger and Gaudin, 2002). Le dépistage a pour but de détecter la présence de résidus dans un échantillon grâce à des techniques de microbiologie, d'immunologie ou plus récemment de chromatographie. La confirmation se fait principalement par une méthode de HPLC ou de LC-MS/MS permettant d'identifier et de quantifier la ou les substance(s) active(s) résiduelle(s).

Les méthodes de dosage qui sont développées pour la confirmation doivent être spécifiques, précises et justes, pour permettre de quantifier exactement une substance active dans une denrée d'origine animale, sans être trop contraignantes pour les dosages réalisés en routine. L'utilisation de l'approche globale peut permettre la simplification de la validation d'une procédure analytique ainsi qu'un gain de temps d'analyse lors des dosages en routine (Hubert *et al.*, 2004; Rozet *et al.*, 2007). L'application de cette approche globale pour le développement et la validation d'une méthode de dosage de la spiramycine et de son métabolite actif (néospiramycine) dans le lait de trois espèces (vache, chèvre et brebis) est présentée dans l'article ci-dessous.

5.1.2. Article accepté

Cet article a été accepté dans le **Journal of Chromatography B**.

A liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the quantification of spiramycin and its active metabolite neospiramycin in milk of major and minor species: validation using the accuracy profile

Jennifer Tardiveau^{1,2\$}, Gael Touchais^{3\$}, Marie-Pierre Chotard-Soutif³, Marie-Pierre Lagrée³, Dominique Hurtaud-Pessel³, Nicolas Grégoire^{1,2,4}, Alexis Viel³, Michel Laurentie^{3*}

^{\$}These authors contributed equally

¹INSERM U1070, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers, France

²UFR of Medicine and Pharmacy, University of Poitiers, France

³French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Laboratory of Fougères, 10B rue Claude Bourgelat, Bioagropolis, Javené, F-35306 Fougères, France

⁴Toxicology-Pharmacology, University Hospital Center of Poitiers, France

*Corresponding author, michel.laurentie@anses.fr

1. Introduction

Spiramycin is a macrolide antibiotic mainly used in veterinary medicine for the treatment of respiratory infections in food producing animals and mastitis in lactating cows. This drug can also be used off-label on so-called minor species such as lactating ewes and goats, within the cascade principle in the European Union [1].

Several studies have already been published on the pharmacokinetic of spiramycin in lactating cows after parenteral administrations [2],[3] showing a metabolization into a polar derivative named neospiramycin I, with similar antibiotic activity (Fig. S1 in supplementary materials) [4]. The concentrations of both compounds are higher in milk than in plasma, as shown by the milk-to-plasma ratio between 50 to 60 [2],[4]. However, much less is known about the distribution of spiramycin and neospiramycin in the milk of minor species.

The Maximum Residue Limit (MRL) for spiramycin is set at $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for the sum of spiramycin and neospiramycin as marker residues in milk of cows in European Union [5]. The withdrawal period, defined as the time required for the sum of spiramycin and neospiramycin concentrations in milk to fall below the MRL, is set at 13.5 days for the standard dosing regimen (against mastitis) of $30\,000 \text{ UI.kg}^{-1}$ for 2 days for cows. For the off-label use of spiramycin in minor species, for which no MRL has been defined in milk, a standard withdrawal period of at least 7 days must be respected. This arbitrary establishment of withdrawal periods for minor species may present a risk. Indeed, the presence of antibiotic residues in milk can favor the emergence of bacterial resistance within the intestinal microbiota of the consumer [6]. Determination of the concentrations of spiramycin and its active metabolite, neospiramycin, in goat and ewe milk is therefore important to assess the suitability of withdrawal times for these species. To be able to quantify concentration of the antibiotic and

its active metabolite in the milk of the three species, it is necessary to develop a specific and selective analytical method, able to quantify a wide range of concentrations of both analytes, from high concentrations of the first post-administration milking to concentrations below the MRL after several days, useful for residue depletion studies.

For the assay of this antibiotic and its active metabolite in plasma of cow, in milk of goat, cow and sheep, and in animal feeding products, various analytical methods are described in the literature, using microbiological assay or liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [3], [7]–[11]. The microbiological method measures only unbound analyte (spiramycin and neospiramycin) which is the active fraction, whereas the LC-MS/MS method is more sensitive and include an extraction step that allow the measure of both free and bound analyte to milk components, which is necessary to control the level of residues [12]. However, the currently validated analytical methods did not allow the quantification of both spiramycin and its active metabolite in all three milks simultaneously.

Having a single assay method for multiple analytes and matrices simplifies routine analysis because there are fewer standards to prepare for each analyte and they are prepared in a single matrix. A previous article published by our lab [13] used the accuracy profile to develop a single regression model for the quantification of ceftiofur in muscle, kidney and plasma from poultry. To our knowledge, it is the first paper reporting a unique validated method for the determination of a contaminant in different matrices of the same animal species. The main objective of the present work was to use the same “accuracy profile” approach to develop and validate a single LC-MS/MS method for the assay of spiramycin and neospiramycin, in the same matrix (milk) of three milk-producing species, either major (*i.e.*, cow) or minor (*i.e.*, goat and ewe) ones. Finally, to demonstrate the applicability of the method in routine use, milk

samples from lactating ewes, goats and cows treated with spiramycin were assayed using the developed method.

2. Materials and methods

2.1. Chemical, reagents and solutions

2.1.1. Analytical reference standards and standard solutions

Spiramycin is composed mostly of spiramycin I (85%) and a minority of spiramycin II and III (<5% and 10%, respectively) [14], therefore only spiramycin I was considered (Fig. S1). Spiramycin I was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, USA), isotopically labelled internal standard (spiramycin I-d3) and neospiramycin I (spiramycin metabolite) were purchased from Cluzeau (Sainte Foy la Grande, France). Individual stock solutions at 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ were prepared in methanol for spiramycin I and for neospiramycin I. Spiramycin I-d3 was prepared at a concentration of 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ in methanol. All these solutions were stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ during one year for spiramycin I and six months for neospiramycin I [15]. One mixed intermediate standard solution of spiramycin I and neospiramycin I at 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (WIS₁) was prepared by diluting stock standard solution in methanol and was stable for at least 24 days at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Intermediate solution of deuterated standards at 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (WIS₂) was prepared by diluting stock standard solution in methanol. These intermediate solutions (WIS₁ et WIS₂) were diluted in water to prepare working standard mixed solutions at concentration of 2, 20 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ for mixed spiramycin – neospiramycin (WSS₁ and WSS₂, respectively) and a working deuterated internal standard solution (WSS₃) at 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. These solutions were prepared fresh daily.

2.1.2. Chemicals and reagents

Acetonitrile HPLC grade, acetonitrile optima® LC/MS grade, methanol analytical reagent and disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate (Na_2EDTA) were supplied by Fisher Scientific (Leicestershire, England). Formic acid (98-100%) and ammonium acetate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dimethyl sulfoxide was obtained from VWR International (Leuven, Belgium). Deionized water was prepared using a Milli-Q-system (Millipore, Bedford, MA, USA).

A Na_2EDTA 20 mM solution was prepared by dissolving 0.744 g of Na_2EDTA dihydrate in 100 ml volumetric flask with deionized water. An ammonium acetate buffer (2 M) was prepared by dissolving 15.4 g of ammonium acetate in 100 ml volumetric flask with deionized water. A dilution of $1/10^{\text{th}}$ in deionized water was done to obtain an ammonium acetate buffer at 0.2 M.

2.2. Sample extraction and purification

Concentrations of spiramycin and neospiramycin were quantified in the milk of goat, ewe and cow. The principle of the sample preparation was based on a liquid-liquid extraction followed by a concentration step under a gentle stream of nitrogen.

First, the weighted sample (2.00 ± 0.02 g) was fortified with internal standard by adding 200 μl of deuterated internal standard solution at $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Then, 500 μl of Na_2EDTA dihydrate at 20 mM was added, the sample was mixed and allowed to stand for 10 minutes before extraction. After adding 8 ml of acetonitrile HPLC grade, the tube was vortex-mixed vigorously for 30 seconds at maximum speed, shaken for 10 minutes with a rotative stirrer at 100 rpm, and

then centrifuged at 14 000 g for 5 minutes at 4 °C. Subsequently, 3 ml of the supernatant was transferred into a new clean tube containing 50 µl of Dimethylsulfoxyde (DMSO). Tubes were placed into the evaporation compartment at 50 °C, left for 15 minutes without nitrogen and then submitted for 90 minutes under a gentle stream of nitrogen. DMSO was added to avoid dryness evaporation and prevent compounds degradation, the extracts were resuspended in 550 µl of acetate ammonium solution at 0.2 M and filtered through a 0.45 µm polyvinylidene difluoride (PVDF) filter towards a 650 µL polypropylene vial from Interchim prior to LC–MS/MS analysis.

2.3. LC-MS/MS analysis

The LC system was composed of an Accela pump and a Thermo CTC - Pal (Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France). The chromatographic separation was performed on a core shell reversed phase HPLC column Kinetex® C18 from Phenomenex (100 mm × 2.1 mm; 2.6 µm) equipped with a guard column Symmetry C18 from Phenomenex (4 mm × 2 mm). The mobile phase consisted of [A] deionized water containing 0.2% formic acid and [B] acetonitrile containing 0.2% formic acid with a gradient elution at 350 µl.min⁻¹ flow rate as follows (t in min): t₀, A = 90%; t₅, A = 20%; t_{5.1}, A = 0%; t_{5.5}, A = 0%; t_{5.6}, A = 90% and column pressure balancing up to 7.5 minutes. The injection volume was 5 µl and the column oven was maintained at 28 °C.

The LC system was coupled to a TSQ Vantage triple quadrupole mass spectrometer (Thermo scientific, Villebon sur Yvette, France) equipped with an electrospray ionization source (H-ESI). Data acquisition and integration were performed using Xcalibur™ version 2.2. The mass spectrometer was operated in positive ESI mode. The source parameters were as

follows: spray voltage: 2 800 V; sheath gas pressure: 50 (arbitrary unit); ion sweep gas pressure: 3 (arbitrary unit); aux gas pressure: 15 (arbitrary unit); capillary temperature: 275 °C; vaporizer temperature: 250 °C; collision pressure: 1 (arbitrary unit); FWHM: 0.7. Argon was used as the collision gas; nitrogen was used as the nebulization and desolvation gas. The mass spectrometer was operated in a multiple reaction monitoring (MRM) mode selecting one transition for each analyte and one for deuterated internal standard. Individual solutions at 0.5 µg.ml⁻¹ of spiramycin, neospiramycin and spiramycin-d3 were infused into the H-ESI source of the mass spectrometer to select the most sensitive and representative transitions. Spiramycin and neospiramycin were ionized in protonated form in electrospray positive ion mode to form doubly charged $[M+2H]^{2+}$ ions and spiramycin-d3 $[M+2H]^{2+} {}^{13}C$ ion was chosen as the internal standard (IS) for both analytes. The ¹³C isotope was used for spiramycin d3 because of the presence of interferences related to the isotopic profile of spiramycin which is a large molecule. Indeed, standards of each analyte were injected individually (n=3) and interferences transitions were studied on the transition of spiramycine-d3: (i) $[M+H]^+ > 174.1$ m/z, (ii) $[M+2H]^{2+} > 174.1$ m/z and (iii) $[M+2H]^{2+} {}^{13}C > 174.1$ m/z. A response was observed on each transition of spiramycin-d3 when injecting the standard of spiramycin and represented 3.3% on $[M+H]^+ > 174.1$ m/z, 16.5% on $[M+2H]^{2+} > 174.1$ m/z and 3.3% on $[M+2H]^{2+} {}^{13}C > 174.1$ m/z. The spiramycin-d3 $[M+2H]^{2+} {}^{13}C > 174.1$ m/z transition was retained as it had good peak intensity and low interaction with the spiramycin isotope cluster. The MRM acquisition parameters: retention time, S-lens, collision energy, m/z precursor ion, m/z product ion was shown in Table 1.

Table 1. Specific MS settings and chromatographic characteristics of spiramycin I, neospiramycin I and spiramycin I-d3 acquired with Kinetex C18 (Phenomenex).

Parameters	Spiramycin I	Neospiramycin I	Spiramycin I-d3
Elemental composition	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	C ₃₆ H ₆₂ N ₂ O ₁₁	C ₄₃ H ₇₁ D ₃ N ₂ O ₁₄
Retention time (min)	2.59	2.44	2.60
Ion nature	[M+2H] ²⁺	[M+2H] ²⁺	[M+2H] ²⁺ ¹³ C
m/z precursor ion	422.1	350.4	424.0
m/z product ion	174.1	174.1	174.1
S-Lens	91	94	101
Collision Energy (volt)	21	16	20

2.4. Selectivity and stability

The following two parameters were evaluated before the assessment of the performance of the analytical method. (i) Selectivity: four different batches of goat, cow and ewe milks (blank matrices), respectively, were analyzed to evaluate potential interference peaks at the retention time (RT) of spiramycin, neospiramycin and spiramycin-d3. The area of peaks attributable to interfering components must not exceed 20% of the peak area of analytes (spiramycin, neospiramycin) at the lower limit of quantification (LLOQ, determined with the global accuracy profile described in section 2.5.2) and not exceed 5% of the peak area of internal standard (spiramycin-d3) used in calibration standard and quality controls (defined in sections 2.5.1 and 2.7), for each matrix. (ii) Stability: spiramycin and neospiramycin stability

were assayed in several conditions. First, twelve independent samples of spiramycin and neospiramycin spiked at $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (equal to the MRL) in milk were prepared without IS. Three of these samples were spiked with IS and then extracted and injected while the others ($n=9$, without IS) were frozen. At each freeze-thaw cycle, all the samples were unfrozen and only 3 samples were spiked with IS and then extracted and injected while the others (without IS) were frozen again.

Secondly, stability of three extracts of spiramycin and neospiramycin spiked at the MRL level was determined at time zero and after 24 h of storage at room temperature. For both stability studies, the average ratios (area of analyte peak over the area of internal standard peak) were compared before and after the stability conditions. A tolerance of $\pm 15\%$ of the nominal value was considered acceptable.

2.5. Validation concept

The aim of the article was to develop a unique method to assay the two analytes in the three milks. Similarly to the study of Mompelat *et al.*, [13] two experimental steps were used during the validation process: (i) determination of the most relevant response function using calibration standards; (ii) assessment of the precision and the trueness of the analytical method thanks to the use of validation standards, as defined below. All the calculations were carried out by using the E-NOVAL software Version V4.1c PROD (Pharmalex, Mont-Saint-Guibert, Belgium).

2.5.1. Definitions and experimental process

Before describing the methods used to build accuracy profile (see section 2.5.2.), it is necessary to define some concepts to avoid ambiguous meanings.

(i) Calibration standards (CS) were made by addition of known concentrations of the analytes of interest (spiramycin and neospiramycin, diluted from the WSS₂ solution for the higher concentration level, or from the WSS₁ solution for the other concentration levels) to blank matrix prior to extraction. They were prepared in the milk of each species at six concentration levels between 0.20 to 10 times the MRL: 40, 80, 200, 600, 1000 and 2000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Regression on a scatterplot between CS duplicates was used to build a response function

(ii) Response function also known as calibration curve, is obtained from the CS. It is a regression model reflecting the relationship between the response (area of the peak of the analytes of interest over area of the peak of the internal standard) and the concentration of the analytes within the assay interval. Several regression models corresponding to linear, linear through 0, weighted linear, linear with logarithm transformation, linear regression with square root, quadratic and weighted quadratic regressions were tested for each analyte and each matrix.

(iii) Validation standards (VS) were made with the same process, with the same stock solutions and for the same concentrations as for the CS, but separately from the CS. VS were used to assess trueness and precision of the analytical method.

(iv) Trueness refers to the closeness of the average experimental value to the acceptable reference value, and was represented as relative bias (%). It was calculated from VS over the six concentration levels.

(v) Precision refers to the random error of the method and was represented by two parameters. The repeatability, corresponding to within series variance (relative standard

deviation, RSD %), and the intermediate precision (RSD %), represented the sum of the within series variance and the between series variance determined during validation series. As trueness, it was calculated from the six levels of VS.

(vi) For each analyte and milk, the validation process of the analytical method was carried out on three validation series. In a validation series, the 6 levels of CS (0.2 to 10 times the MRL) and the 6 levels of VS (0.2 to 10 times the MRL, prepared separately from the CS) were prepared in duplicate and then extracted and injected (i.e. 12 CS and 12 VS injected). The scatterplot of CS was used to establish a response function. VS were back calculated from this response function. Three validation series were performed per analyte and per matrix (i.e. 36 CS and 36 VS injected). All in all, counting the 3 matrices (cow's milk, goat's milk, sheep's milk) and the 2 analytes (spiramycin and neospiramycin), a balanced set of 216 CS (36×3 matrices $\times$ 2 analytes) and 216 VS were injected over 18 validation series (2 analytes $\times$ 3 matrices $\times$ 3 validation series).

2.5.2. Accuracy study

A statistical tools based on total error approach and so called accuracy profile, was used to validate the analytical method [16]–[18]. Briefly, it consisted in building a tolerance interval (Eq. 1), based on the optimal response function, and considering the trueness (bias) and precision (repeatability and intermediate precision) of the method, in which a percentage value (β), to be defined, of the future measurements should fall. In this study, a β -value of 80% was chosen. This β -expectation tolerance interval (β -TI) should be included within the acceptance limits (λ), the latter being defined in accordance with the future use of the method. The

acceptance limits were set beforehand at 20% for the LLOQ and 15% for the next levels, a classical choice for bioanalytical procedures [6] [16].

$$\beta TI = \left[\begin{array}{c} bias(\%)_j - Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \times \sqrt{1 + \frac{1}{p \times n \times B_j^2}} RSD_{IP,j} ; \\ bias(\%)_j + Q_t\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \times \sqrt{1 + \frac{1}{p \times n \times B_j^2}} RSD_{IP,j} \end{array} \right] \quad (1)$$

$$\text{with } bias(\%)_j = \frac{\hat{\mu}_j - \hat{\mu}_{Tj}}{\hat{\mu}_{Tj}} \times 100 ; RSD_{IP,j} = \frac{\hat{\sigma}_{IP,j}}{\hat{\mu}_j} \times 100 ; B_j = \sqrt{\frac{r_j + 1}{n \times r_j + 1}} ; r_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{W,j}^2}$$

where p is the number of series (3 per analyte and per matrix = 18 series), n is the number of independent duplicates per series (2 per sample level), $\hat{\mu}_j$ is the estimate of the mean results of the jth concentration level (0.2 to 10 * MRL), $\hat{\mu}_{Tj}$ is the theoretic mean of the jth concentration level, $\hat{\sigma}_{IP,j}$ is the estimate of the intermediate precision variance at the jth concentration level, which is the sum of the within series variance ($\hat{\sigma}_{W,j}^2$), and between series variance ($\hat{\sigma}_{B,j}^2$), $Q_t \times \left(v; \frac{1+\beta}{2}\right)$ is the β (80%) quantile of the Student t distribution with v degrees of freedom

$$\text{estimated by } \frac{(r+1)^2}{\frac{(r+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}}.$$

Several accuracy indexes were used as previously described [19]: (i) the trueness index (I_T) (Eq.2) corresponding to one minus the ratio of the sum of squares of deviations between observed bias and maximum tolerance bias at each concentration level included in the dosing range; (ii) the precision index (I_P) (Eq.3) defined as the ratio between the area defined within the acceptance limits and the limits of the β -TI, and the area defined by the upper and lower acceptance limits, for which the method is considered as valid; (iii) the dosing range index (I_{Dr}) (Eq.4) representing the extent of the validated range according to the lowest and highest defined

point; (iv) accuracy index (I_A) (Eq.5) calculated as the geometric mean of the three-following indexes.

The lower and upper limits of quantification, LLOQ and ULOQ respectively, were defined as the concentrations for which the β -TI crossed the acceptance limits. The LOD was defined at one third of the LLOQ [20] .

$$I_T = \frac{SSB_{Max} - SSB_{Obs}}{SSB_{Max}} \quad (2)$$

$$I_P = \frac{U_{Area} + L_{Area}}{AREA_{Max}} \quad (3)$$

$$I_{DR} = \frac{U_{LOQ} - L_{LOQ}}{DR_{Max}} \quad (4)$$

$$I_A = \sqrt[3]{I_T \times I_{DR} \times I_P} \quad (5)$$

with SSB_{Max} is the sum of the square of the maximum bias at each concentration level investigated by the VS included in the dosing range, SSB_{Obs} is the sum of the square of the observed bias at each concentration level also included in the dosing range, U_{Area} is the area defined by the upper β -expectation tolerance limits and the upper acceptance limits $+\lambda$ and included between the lower limit of quantification (L_{LOQ}) and the upper limit of quantification (U_{LOQ}), L_{Area} is the area between the lower β -expectation tolerance limits and the lower acceptance limits $-\lambda$ and included between the L_{LOQ} and the U_{LOQ} , $AREA_{Max}$ is the area defined by the upper and lower acceptance limits $\pm\lambda$ and the L_{LOQ} and the U_{LOQ} , DR_{Max} is the difference between the highest and the lowest concentration levels investigated during the validation,.

The aim of our work was to look for a global accuracy profile, associated to a unique and optimal response function, for the two analytes and the three matrices and was conducted in three steps: (i) the best individual profiles (associated to the best response functions and minimizing the impact of this function on its uncertainty) for each analyte and each milk were

selected according to the accuracy indexes (the higher, the better) and to the inclusion of the β -TI within the acceptance limits. (ii) Intermediary profiles were established for spiramycin and neospiramycin by pooling CS and VS results obtained for the 3 different milks, as described in the first step. (iii) A global (and unique) profile was established for the 2 analytes and the 3 matrices by pooling all data as described in previous steps.

2.6. Relative Expanded Uncertainty

Relative uncertainty is based on the variability of relative bias (%) and intermediate precision variance expressed by RSD % (Eq.6). A 95% confidence interval around the VS measured value is built by considering a cover factor ($k=2$), allowing to calculate the relative expanded uncertainty (REU). REU of the method was measured at each concentration level and used to establish an uncertainty function to determine the uncertainty of any result within the validation concentration range [21] [22]. Several models were tested as linear, exponential, logarithm and second order polynomial regression and the one associated to the best determination coefficient was chosen for the uncertainty function.

$$REU(\%) = 100 \times \frac{2 \times \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 \times \left(1 + \frac{1}{p \times n \times B_j^2}\right)}}{\hat{\mu}} \quad (6)$$

with $B_j = \sqrt{\frac{r_j + 1}{n \times r_j + 1}}$ and $r_j = \frac{\hat{\sigma}_{B,j}^2}{\hat{\sigma}_{W,j}^2}$

where μ is the mean introduced concentration, n is the number of repetitions per series (2 per sample level) and p is the number of series (3 per analyte and per matrix = 18 series).

2.7. Applicability of the method

The aim of this applicability study was to check that the validation procedure using the global accuracy profile allows to reliably predict that 80% (β -value) of future measurements will be within the acceptance limits [23]. For this purpose, an experimental study, approved by the Animal Research Ethics Committee, was carried out on the three animal species (cow, ewe, goat). A total of six healthy individuals of each species received a single dose of 30,000 UI.kg⁻¹ of spiramycin (Spirovet®, Ceva) by intramuscular injection in the neck. Milk samples were taken during morning and evening milkings, separated by 8 hours, for fifteen days following the administration. The developed method was then used in routine to assay the milk samples of the 6 animals per species, 18 animals in total. The 17 samples per animal (0h to 192h post-administration) were analyzed over 18 runs (1 per animal). Each analytical run included quality control (QC) samples containing both spiramycin and neospiramycin at three concentration levels (50, 1000 and 1600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) prepared in duplicate, in milk of goat, ewe and cow. Concentration of the two analytes in the QC were then back calculated according to the calibration curve of the global profile obtained from the validation study and accepted according to the bioanalytical procedures described above. According to the FDA guidelines [24], the run was considered compliant when 4/6th of all QC was accepted and the concentration of unknown samples was reported.

3. Results and discussions

3.1. Selectivity and stability

For selectivity, an interfering peak was observed in all batches of each milk species and also without matrix (water injection) at the same retention time of spiramycin $[M+2H]^{2+}>174.1$ m/z, neospiramycin $[M+2H]^{2+}>174.1$ m/z and spiramycin-d3 $[M+2H]^{2+}>174.1$ m/z. The reason for the presence of this interference was due to a low carry over related to the injection seat of the HPLC system. However, it never exceeds 2.5% of the peak area of spiramycin, neospiramycin and spiramycin-d3 compared to the LLOQ of each analyte and to internal standard. Thus, the selectivity of the method was validated. Chromatograms of spiramycin, neospiramycin and spiramycin-d3 in each milk species are shown in Fig. 1.

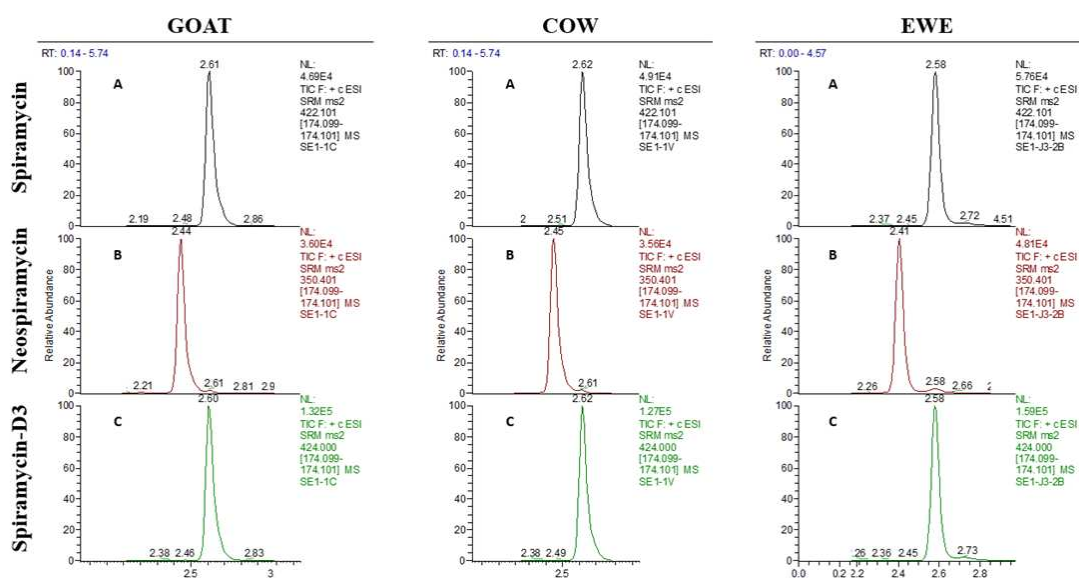


Figure 1. Chromatograms of spiramycin [A], neospiramycin [B] and spiramycin-d3 [C] spiked at $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ in goat, cow and ewe milk.

Spiramycin and neospiramycin were stable after three freeze-thaw cycles in milk spiked at the MRL level ($200 \mu\text{g.kg}^{-1}$) and also after 24 hours at room temperature in the extract. Previous results had already highlighted the good stability of both analytes at $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ in

milk (½ MRL) for 360 days at -18°C [15], the same storage temperature than for experimental samples (see section 3.4.)

3.2. Validation concept

3.2.1. Response function

As explained in section 2.5.2, several steps were carried out to choose the optimal response function of the global profile: (i) The results of all regression models for each individual analyte and milk are detailed in supplementary materials (Table S1). Accuracy indexes (I_A) of related accuracy profiles were of the same order of magnitude (>0.70) for all models. For all individual profiles, the linear model with logarithm transformation ranked in first or second place (comparing I_A) except for neospiramycin in ewe milk but with an I_A close to the top model (0.83 vs 0.87, respectively). Parameters of linear model with logarithm transformation are presented in supplementary material (Table S2) for all analytes and milks. Determination coefficients (R^2) were above 0.998 for each curve of validation series, confirming the adequacy of this regression model. (ii) Combining the results of the three milk species for each analyte in intermediary profiles, the linear model with logarithm transformation also appeared in the top two places. These results confirmed the possibility of using a single regression model as a response function to assay each of the two analytes in the different milks. (iii) Finally, after pooling the two analytes and the three milks in the global profile (Table S1), the linear model with logarithm transformation, with an I_A of 0.88, was kept to get a unique (and reliable) regression model ($R^2 = 0.9991$) according to the parsimony principle. All parameters (slope, intercept) of the final response function are presented in Table 2.

Table 2. Response function parameters obtained with a linear regression model after logarithmic transformation for the common analysis method of spiramycin and neospiramycin in the milk of cow, goat and ewe. Trueness and precision ranges in the whole range of concentrations are reported, as well as indexes of the related global accuracy profile.

	Parameters	Values
Response function	Intercept	-1.956
	Slope	0.9325
	R ²	0.9991
Trueness	Relative bias (%)	[-1.6, 5.7]
Precision	Relative repeatability (RSD %)	[1.1, 2.7]
	Relative intermediate precision (RSD %)	[2.5, 4.2]
Indexes	Accuracy index (I _A)	0.8795
	Dosing range index (I _{Dr})	1.000
	Precision index (I _P)	0.7077
	Trueness index (I _T)	0.9613

These results, obtained only from CS analysis, confirmed that both spiramycin and neospiramycin could be quantified in the milk of all three species using the same response function.

3.2.2. Accuracy study

3.2.2.1. Trueness and precision

For each individual profiles, trueness and precision measurements were within defined acceptance criteria of $\pm 15\%$ (Table S3). The widest range of relative bias was -5.5% to 6.8% for the accuracy profile of spiramycin in cow milk. Regarding the repeatability and the intermediate precision, the widest range was 0.5% to 3.9% for spiramycin in ewe milk and 1.5% to 5.9% for neospiramycin also in ewe milk, respectively.

Main results of trueness and precision of the global profile are presented in Table 2. Ranges of relative bias, relative repeatability and relative intermediate precision were -1.6% to 5.7%, 1.1% to 2.7% and 2.5% to 4.2%, respectively, showing that trueness and precision were adequately included within the acceptance criteria of $\pm 15\%$. This highlighted that both the extraction method and the use of the spiramycin-d3 as internal standard for the two analytes gave satisfactory results to validate the method.

3.2.2.2. Accuracy profile

Individual accuracy profiles for each analyte in the milk of cow, goat and ewe (as described in section 2.5.2) and their related indexes are shown in supplementary data (Table S4; Fig. S2). Individual profiles revealed that precision indexes of both analytes in ewe milk were lower than those of other species, as confirmed by lower accuracy indexes in this milk. The variation in milk composition of the different species may explained the observed precision differences. Indeed, ewe's milk is fattier and has a higher concentration of proteins than the milk of the other two species [25] [26]. As the extraction procedure was the same for the 3 milks, it was possible to build intermediary accuracy profiles of spiramycin and neospiramycin (Table S4; Fig. S2) with accuracy indexes (I_A) of 0.88 and 0.87, respectively. These profiles confirmed that the accuracy profile is within the acceptance limit and allowed to quantify each analyte in the 3 milks for the whole tested dosing range.

The global accuracy profile (Fig. 2) was built by using the average parameters of the chosen response function (see section 3.2.1), *i.e.*, using all validation series. This construction was possible due to the common range of concentration of both analytes. The global profile was in total agreement with the defined accuracy criteria, as the β -TI was completely included

within acceptance limits. All the related indexes of this profile are presented in Table 2. The dosing range index equal to 1 meant that the whole dosing range tested (40 to 2000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) could be quantified with the defined accuracy without exceeding the acceptance limits, for spiramycin and neospiramycin in the different milks. The LLOQ and ULOQ were therefore defined at 40 and 2000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectively and the LOD was equal to 13 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Trueness and precision indices were of 0.71 and 0.96, respectively, showing an analytical method with great performance, as confirmed by the accuracy index of 0.88. Indeed, as some milks are more difficult to obtain, notably goat and ewe milk, the global accuracy profile of the three milks would simplify routine assays by preparing QC samples in the most accessible milk.

Overall, the global response function (Fig. 2) accurately quantified spiramycin and its active metabolite neospiramycin in milk from three different species over a concentration range from 0.2 to 10 times the MRL. Thanks to this unique model, residue depletion studies in milk can be done more easily using only the milk of the major species, and faster with a single series of QC spiked with spiramycin and neospiramycin in a single type of milk.

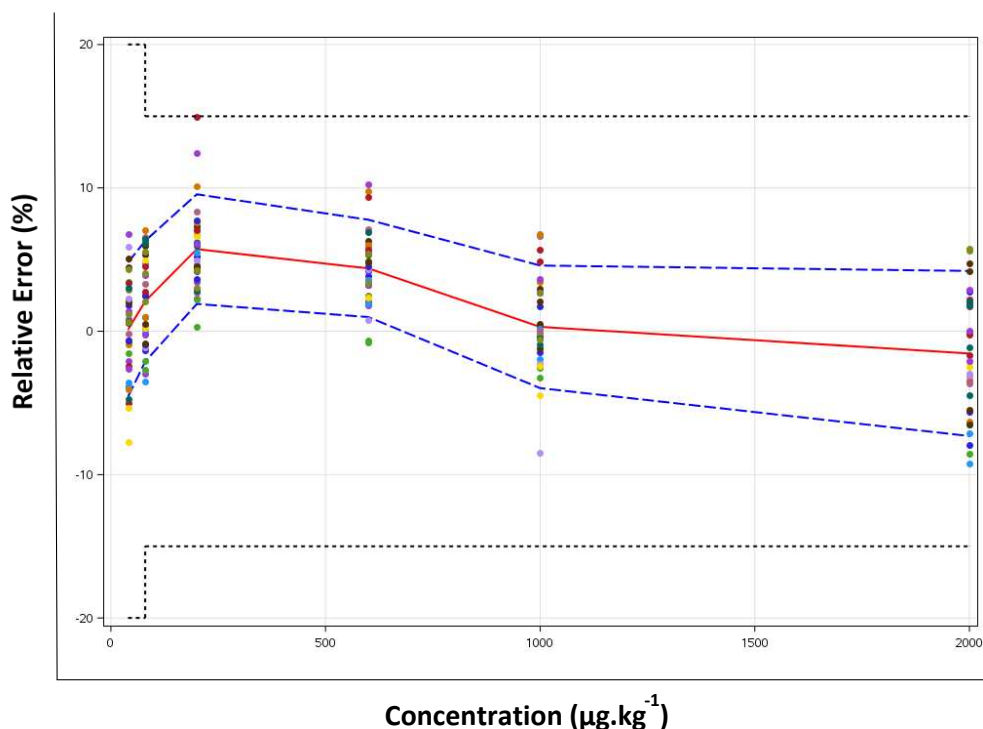


Figure 2. Global accuracy profile of spiramycin and neospiramycin in the milk of goat, cow and ewe. These profiles were obtained by considering a linear regression model after logarithmic transformation, in a range of 0.2 to 10 times the maximal residue limit. The plain red line is the relative bias, the dashed blue lines are the β -expectation tolerance limits (with β set at 80%), and the dashed black lines represent the acceptance limits (with λ set at 20% for LOQ and 15% for other levels). The dots represent the relative error of the back-calculated concentrations of validation standards and are plotted with respect to their targeted concentration.

3.3. Relative Expanded Uncertainty

All REU data (%) obtained with the global accuracy profile (Fig. 2) were presented in Table 3.

Table 3. Relative Expanded Uncertainty (%) obtained from suit data of spiramycin and neospiramycin in the milk of cow, goat and ewe.

Concentration level ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Relative Expanded Uncertainty (%)
40	7.14
80	6.43
200	5.83
600	5.17
1000	6.49
2000	8.66
Average	6.62

The maximum REU obtained during validation series was estimated at 8.66% for the ULOQ level. The average REU of the whole dosing range was 6.62%, confirming the high precision of the method. From all tested models, the polynomial (order 2) function was chosen ($R^2=0.834$) to model the REU as a function of time, as shown in Fig.3.

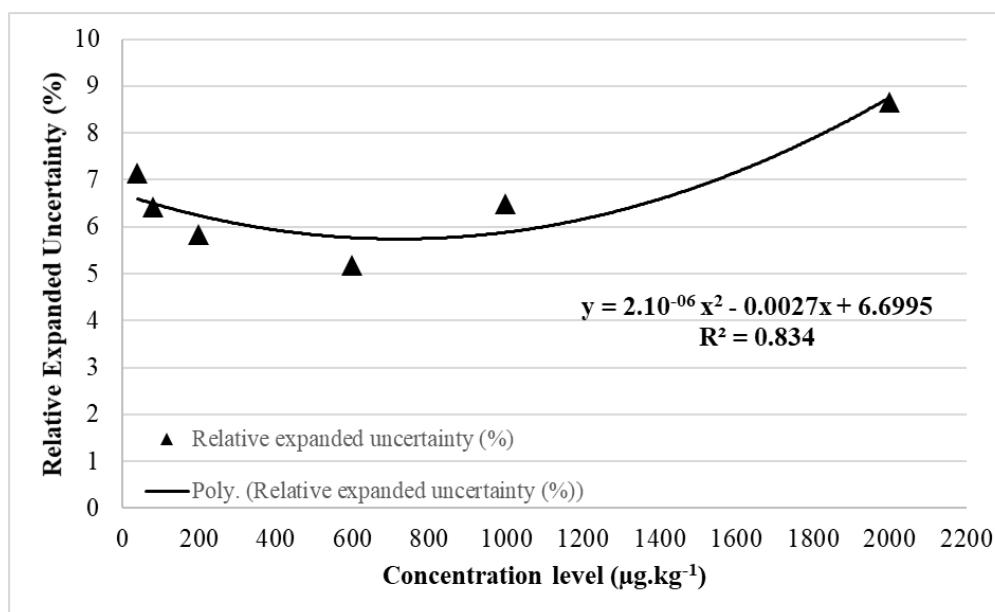


Figure 3. Polynomial (order 2) regression curve for determination of relative expanded uncertainty (%). The function was located in the range of 40 – 2000 µg.kg⁻¹ of spiramycin and neospiramycin in the three milks.

The REU is quite low for all concentration levels. As observed by Wang *et al.*, (2009) [7], this can be explained by the choice of transitions, which are specific and sensitive. We can see that the calculated expanded uncertainty is highest for the higher level of concentration (2000 µg.kg⁻¹). This result is explained by largest deviation of results at this concentration (see Fig. 2) and by an extensive concentration range (40 to 2000 µg.kg⁻¹) of study that reached a high concentration near the detection saturation. This model was built based on the global accuracy profile; thus, it was adapted to the response function and applicable to experimental concentration levels between two concentrations levels within the validated range of 40 to 2000 µg.kg⁻¹.

3.4. Applicability to real samples

Several individual milk samples of cows, goats and ewes containing unknown concentrations of spiramycin and neospiramycin were assayed in routine with the developed method. Results of this depletion study of spiramycin and neospiramycin in the milk of one representative animal of each species are shown in Fig. 4.

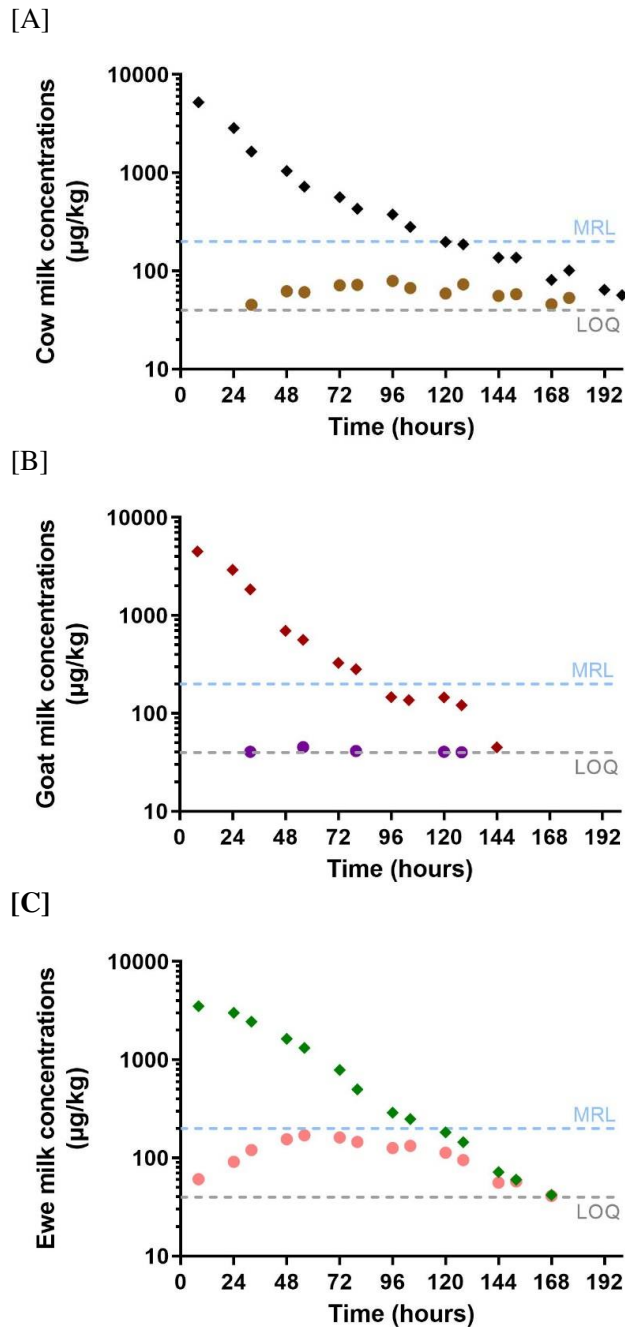


Figure 4. Semi-logarithmic plots of concentrations of spiramycin (rhombus) and neospiramycin (circle) residues in milk of cow [A], goat [B] and ewe [C] after one intramuscular injection of 30000 UI.kg^{-1} at $t=0\text{h}$. Maximum residues limits (MRL), equals to $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$, is the sum of spiramycin and neospiramycin residues allowed in marketed milk after 3 injections. The lower limit of quantification (LLOQ) was $40 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

For samples with spiramycin concentrations above the ULOQ, a dilution factor of 10 was evaluated and then applied. Relative bias(%) was calculated for the six QC levels obtained over the 18 runs of routine (see Fig. S2). As observed with the figure S2 [A] and [B], 102 out of 108 QC (*i.e.*, 94.4%) were within the acceptance limits and none of the 18 series were rejected. According to the observed data (Fig. 4), spiramycin was slowly eliminated in the milk of all three species and was detected above the LLOQ for up to 6 days (144h) for minor species and 8 days (192h) for cow. The spiramycin profile for goat was in good agreement with results from a recent publication using the same dose in lactating goats [27]. The sum of spiramycin and neospiramycin concentrations fell below the MRL ($200 \mu\text{g.kg}^{-1}$) from day 6 onwards for cow and ewe and for day 4 for goat. The analytical method developed in this paper allows the quantification of spiramycin and its metabolite in the milk of the three species from the high concentration present in the first milking post-administration (8h) to concentrations at 0.20 times the MRL several days post-administration. In further studies, it will be interesting to assess how animal physiology impacts the antibiotic distribution in milk of each species. To this purpose, physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling, considering animal physiology, milk composition and physico-chemical properties of the drug, will be discussed in a future paper.

4. Conclusion

The present LC-MS/MS method allowed the simultaneous quantification of residues of spiramycin and its active metabolite neospiramycin in cow's milk as well as in the milk of minor species, goat and ewe. A unique linear regression model after logarithmic transformation of the data permitted to determine the concentrations of both analytes in the three milks, in a wide

range from 0.2 to 10 times the MRL. The global accuracy profile, using the results of the two analytes in the milk of the 3 species, demonstrated that 80% of future measurements in routine assays will be within the acceptance limits set at 20% for the LLOQ and 15% for the other concentration levels. The use of spiramycin d3 as internal standard was relevant and allowed a high precision and accuracy of the quantification method. The unique accuracy profile was of great interest for studying antibiotic elimination in food products of animal origin and has been confirmed by the determination of both analytes in milk samples of cow, goat and ewe milk treated with spiramycin. Thanks to this unique assay method, it will now be possible to quantify the whole kinetic of spiramycin and neospiramycin in milk of minor species by using only the most accessible milk spiked with both analytes at 3 concentrations levels in the validated range (in duplicate).

Acknowledgements

We thank Emilie Wimmer, Denis Boulenger, Melaine Sauvée, Bertrand Minaud, Melanie Bouteille and Jeremy Roger, the team of agricultural high schools of Melle and Venours for the help in the realization of *in vivo* experimentations. We would additionally like to thank Thierry Vidard and Jean-Guy Rolland for technical support and Carine Paraud for her implication in the project.

Supporting Information

Table S1. The best tested regression models of individual profiles, intermediary profiles and global profile.

Table S2. Parameters of linear regression models after logarithmic transformation of individual profiles.

Table S3. Trueness and precision parameters of individual and intermediary profiles.

Table S4. Accuracy indexes of individual and intermediary profiles.

Figure S1. Accuracy profiles of individual and intermediary profiles.

Figure S2. Observed relative errors of QC samples used in routine assay.

Conflict of Interest

Authors do not declare any conflicts of interest for this particular work.

References

- [1] Directive of the European Parliament and of the Council 2001/82/CE of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products [2009] OJ L 311, 28.11.2001, p. 1
- [2] L. Renard, P. Sanders, M. Laurentie, and J.-M. Delmas, "Pharmacokinetic-pharmacodynamic model for spiramycin in staphylococcal mastitis," *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 19, no. 2, pp. 95–103, Apr. 1996, doi: 10.1111/j.1365-2885.1996.tb00019.x.
- [3] P. Sanders *et al.*, "Pharmacokinetics of spiramycin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in lactating cows," *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 15, no. 1, pp. 53–61, Mar. 1992, doi: 10.1111/j.1365-2885.1992.tb00986.x.
- [4] P. Mourier and A. Brun, "Study of the metabolism of spiramycin in pig liver," *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, vol. 704, pp. 197–205, Jan. 1998, doi: 10.1016/S0378-4347(97)00477-5.
- [5] Commission Regulation (EU) 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin [2020] OJ L 015 20.1.2010, p. 1
- [6] Reflection paper on off-label use of antimicrobials in veterinary medicine in the European Union, EMA/CVMP/AWP/237294/2017 of 24 May 2017 of Committee for Medicinal Products for Veterinary Use, Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-label-use-antimicrobials-veterinary-medicine-european-union-first-version_en.pdf
- [7] J. Wang and D. Leung, "Determination of spiramycin and neospiramycin antibiotic residues in raw milk using LC/ESI-MS/MS and solid-phase extraction," *J Sep Sci*, vol. 32, no. 4, pp. 681–688, Feb. 2009, doi: 10.1002/jssc.200800599.

- [8] C. Civitareale, M. Fiori, A. Ballerini, and G. Brambilla, "Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC–UV/DAD at 1ppm level," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 36, no. 2, pp. 317–325, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.jpba.2004.06.010.
- [9] M. A. García-Mayor, R. M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, and J. S. Durand-Alegría, "Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk," *J Chromatogr A*, vol. 1122, no. 1–2, pp. 76–83, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.04.019.
- [10] H. Saleh, M. Elhenawee, E. M. Hussien, N. Ahmed, and A. E. Ibrahim, "Validation of HPLC–UV Multi-Residue Method for the Simultaneous Determination of Tetracycline, Oxytetracycline, Spiramycin and Neospiramycin in Raw Milk," *Food Anal. Methods*, vol. 14, no. 1, pp. 36–43, Jan. 2021, doi: 10.1007/s12161-020-01838-9.
- [11] L. Zhang, L. Shi, Q. He, and Y. Li, "A rapid multiclass method for antibiotic residues in goat dairy products by UPLC–quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry," *Journal of Analytical Science and Technology*, vol. 12, no. 1, p. 14, Mar. 2021, doi: 10.1186/s40543-021-00268-4.
- [12] G. Ziv, E. BOGIN, J. SHANI, and F. G. SULMAN, "PENETRATION OF RADIOACTIVE-LABELED ANTIBIOTICS FROM BLOOD SERUM INTO MILK IN NORMAL AND MASTITIC EWES," *Annales de Recherches Vétérinaires*, vol. 5, no. 1, pp. 15–28, 1974.
- [13] S. Mompelat, M.-P. Fourmond, M. Laurentie, E. Verdon, D. Hurtaud-Pessel, and J.-P. Abjean, "Validation of a liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry method for the analysis of ceftiofur in poultry muscle, kidneys and plasma: A unique accuracy profile for each and every matrix," *Journal of Chromatography A*, vol. 1407, pp. 119–129, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.06.043.
- [14] C. Sagan, A. Salvador, D. Dubreuil, P. P. Poulet, D. Duffaut, and I. Brumpt, "Simultaneous determination of metronidazole and spiramycin I in human plasma, saliva and gingival crevicular fluid by LC–MS/MS," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 38, no. 2, pp. 298–306, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.jpba.2004.12.033.
- [15] M. Gaugain, M.-P. Chotard, and E. Verdon, "Stability Study for 53 Antibiotics in Solution and in Fortified Biological Matrixes by LC/MS/MS," *Journal of AOAC International*, vol. 96, no. 2, pp. 471–480, Mar. 2013, doi: 10.5740/jaoacint.12-062.
- [16] Ph. Hubert *et al.*, "Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part I," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 36, no. 3, pp. 579–586, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.jpba.2004.07.027.

- [17] Ph. Hubert *et al.*, “Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 45, no. 1, pp. 70–81, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.jpba.2007.06.013.
- [18] Ph. Hubert *et al.*, “Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal–Part III,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 45, no. 1, pp. 82–96, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.jpba.2007.06.032.
- [19] E. Rozet *et al.*, “Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation: Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 591, no. 2, pp. 239–247, May 2007, doi: 10.1016/j.aca.2007.04.002.
- [20] “GL49: Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies,” p. 21.
- [21] M. Thompson, “Uncertainty functions, a compact way of summarising or specifying the behaviour of analytical systems,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, no. 7, pp. 1168–1175, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.trac.2011.03.012.
- [22] S. Rudaz and M. Feinberg, “From method validation to result assessment: Established facts and pending questions,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 105, pp. 68–74, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.04.013.
- [23] E. Rozet *et al.*, “Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results: The fit-for-future-purpose concept,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1158, no. 1, pp. 126–137, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.03.102.
- [24] V. P. Shah *et al.*, “Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 81, no. 3, pp. 309–312, Mar. 1992, doi: 10.1002/jps.2600810324.
- [25] J. R. Campbell and R. T. Marshall, *Dairy Production and Processing: The Science of Milk and Milk Products*. Waveland Press, 2016.
- [26] C. F. Balthazar *et al.*, “Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 16, no. 2, pp. 247–262, 2017, doi: 10.1111/1541-4337.12250.
- [27] P. Quintanilla, M. C. Beltrán, B. Peris, M. Rodríguez, and M. P. Molina, “Antibiotic residues in milk and cheeses after the off-label use of macrolides in dairy goats,” *Small Ruminant Research*, vol. 167, pp. 55–60, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.smallrumres.2018.08.008.

Supplementary data

Table S1. The best tested regression models of individual profiles, intermediary profiles and global profile

Tested regression models sorted according to the Accuracy Index (IA) in decreasing order for each analyte and each milk individually; for each analyte in the three milks combined; and for the both analytes and the three milks combined. Only the 3 or 4 best regression models are presented.

Analyte	Milk species	Regression model	IA	Associated accuracy profile
Spiramycin	Goat	(1) Weighted (1/X ²) quadratic regression	0.9205	
		(2) Linear regression after logarithm transformation	0.9180	Individual profile (S _{Goat})
		(3) Weighted (1/X) quadratic regression	0.9108	
	Cow	(1) Linear regression after logarithm transformation	0.8327	Individual profile (S _{Cow})
		(2) Weighted (1/X ²) quadratic regression	0.8276	
		(3) Weighted (1/X) quadratic regression	0.8172	
	Ewe	(1) Linear regression after logarithm transformation	0.8012	Individual profile (S _{Ewe})
		(2) Weighted (1/X) quadratic regression	0.7476	
		(3) Quadratic regression	0.7313	
Neospiramycin	Goat	(1) Linear regression after logarithm transformation	0.9026	Individual profile (N _{Goat})
		(2) Weighted (1/X ²) quadratic regression	0.8904	
		(3) Linear regression after square root transformation	0.8899	
	Cow	(1) Linear regression after logarithm transformation	0.8646	Individual profile (N _{Cow})
		(2) Weighted (1/X) quadratic regression	0.8591	
		(3) Weighted (1/X ²) quadratic regression	0.8405	
	Ewe	(1) Weighted (1/X) quadratic regression	0.8757	
		(2) Weighted (1/X ²) quadratic regression	0.8722	
		(3) Quadratic regression	0.8507	
		(4) Linear regression after logarithm transformation	0.8315	Individual profile (N _{Ewe})
Spiramycin	Goat	(1) Linear regression after logarithm transformation	0.8760	Intermediary profile (S _{3 species})
	Cow	(2) Weighted (1/X ²) quadratic regression	0.8744	
	Ewe	(3) Weighted (1/X) quadratic regression	0.8735	

Neospiramycin	Goat	(1) Weighted (1/X) quadratic regression	0.8741	
	Cow	(2) Linear regression after logarithm transformation	0.8725	Intermediary profile (N ₃ species)
	Ewe	(3) Weighted (1/X ²) quadratic regression	0.8698	
Spiramycin Neospiramycin	Goat	(1) Weighted (1/X) quadratic regression	0.8807	
	Cow	(2) Linear regression after logarithm transformation	0.8795	Global profile (SN ₃ species)
	Ewe	(3) Weighted (1/X ²) quadratic regression	0.8789	

Table S2. Parameters of linear regression models after logarithmic transformation of individual profiles

Parameters of linear regression models after logarithmic transformation obtained from calibration standards during the validation series for spiramycin and neospiramycin in each milk individually. Mean $\pm$ standard deviation are presented.

Analyte	Milk	Intercept	Slope	R ²
Spiramycin	Goat	-1.878 $\pm$ 0.019	0.9346 $\pm$ 0.003	0.9995
	Cow	-1.863 $\pm$ 0.009	0.9374 $\pm$ 0.008	0.9988
	Ewe	-1.894 $\pm$ 0.055	0.9277 $\pm$ 0.013	0.9989
Neospiramycin	Goat	-2.057 $\pm$ 0.022	0.9339 $\pm$ 0.007	0.9993
	Cow	-2.044 $\pm$ 0.007	0.9311 $\pm$ 0.002	0.9991
	Ewe	-2.003 $\pm$ 0.041	0.9302 $\pm$ 0.008	0.9993

Table S3. Trueness and precision parameters of individual and intermediary profiles

Minimum and maximum values of bias (%), repeatability and intermediate precision (RSD%) obtained with the related calibration curve in the concentration range of 0.2 to 10 times the maximal residue limit, for individual analyte and milk and individual analyte in the three milks combined.

Analyte	Milk	Trueness	Precision	
		Relative bias (%)	Relative repeatability (RSD %)	Relative intermediate precision (RSD %)
Spiramycin	Goat	-1.5 , 5.7	0.6 , 2.3	0.7 , 3.6
	Cow	-5.5 , 6.8	1.3 , 3.1	2.3 , 4.3
	Ewe	-1.9 , 7.1	0.5 , 3.9	2.2 , 4.5
	Three species	-2.3 , 6.5	1.4 , 2.8	2.3 , 4.0
Neospiramycin	Goat	-0.9 , 5.2	0.5 , 3.0	1.2 , 4.1
	Cow	-4.3 , 4.0	0.8 , 3.0	2.4 , 5.8
	Ewe	-0.4 , 5.8	1.0 , 3.4	1.5 , 5.9
	Three species	-0.9 , 5.0	0.8 , 3.2	2.7 , 4.5

Table S4. Accuracy indexes of individual and intermediary profiles.

Performances results of the linear regression after logarithmic transformation in each and every milk for spiramycin and neospiramycin.

Analyte	Milk	I_A	I_{DR}	I_P	I_T	Corresponding accuracy profile Fig. S1.
Spiramycin	Goat	0.9180	1.000	0.8012	0.9656	[A]
	Cow	0.8327	1.000	0.6285	0.9186	[B]
	Ewe	0.8012	1.000	0.5523	0.9312	[C]
	Three species	0.8760	1.000	0.7110	0.9455	[D]
Neospiramycin	Goat	0.9026	1.000	0.7636	0.9629	[E]
	Cow	0.8646	1.000	0.6697	0.9651	[F]
	Ewe	0.8315	1.000	0.6051	0.9502	[G]
	Three species	0.8725	1.000	0.6839	0.9713	[H]

I_A , accuracy index; I_{DR} , dosing range index; I_P , precision index; I_T , trueness index.

Fig. S1. Accuracy profiles of individual and intermediary profiles

Accuracy profile of spiramycin (S) in milk of goat [A], cow [B] and ewe [C] and the 3 milks [D]; neospiramycin (N) in milk of goat [E], cow [F] and ewe [G] and the 3 species [H]. The plain red line is the relative error, the dashed blue lines are the β -expectation tolerance limits (with β set at 80%), and the dashed black lines represent the acceptance limits (20% for LOQ and 15% for other levels). The dots represent the relative error of the back-calculated concentrations and are plotted with respect to their targeted concentration.

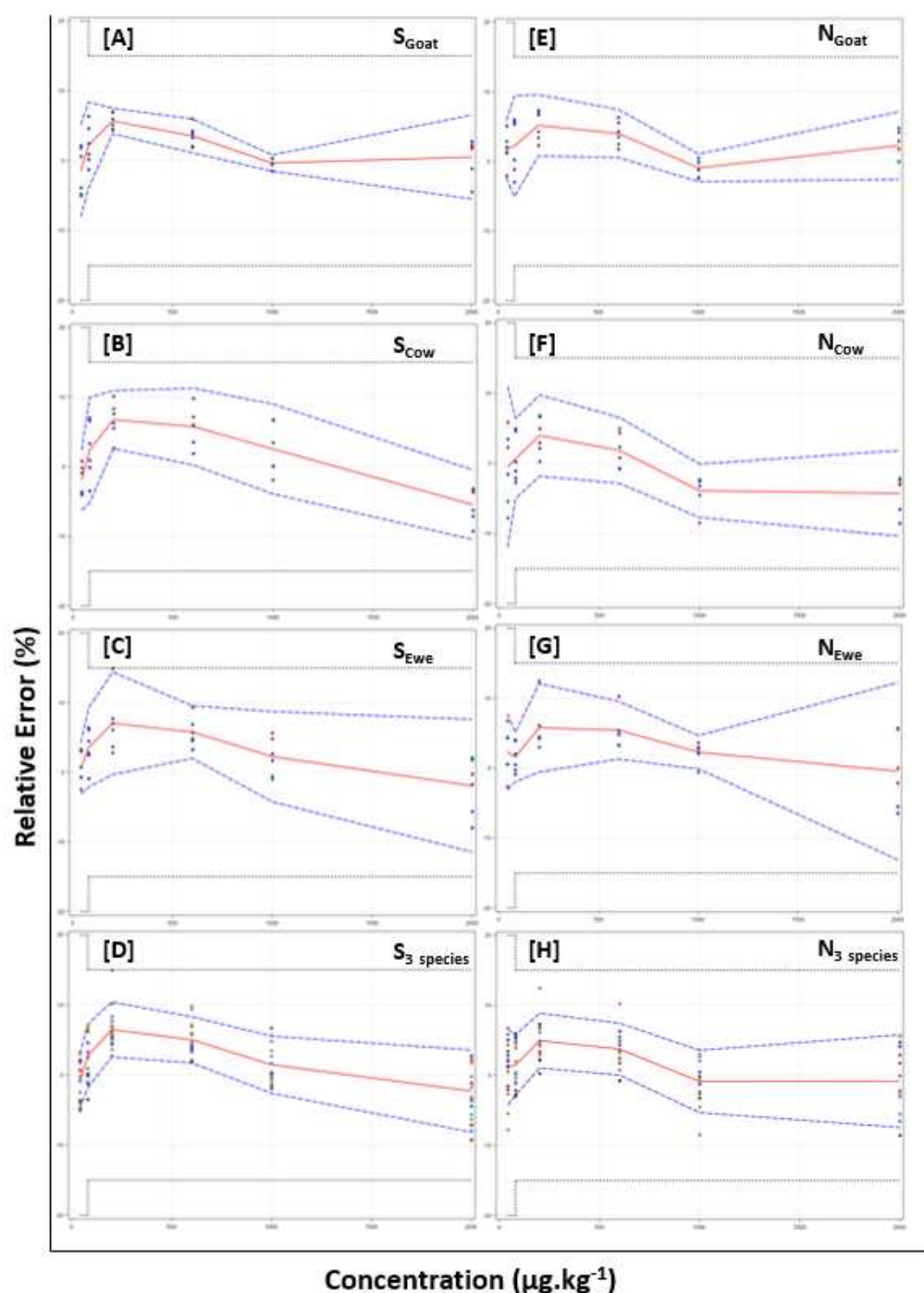
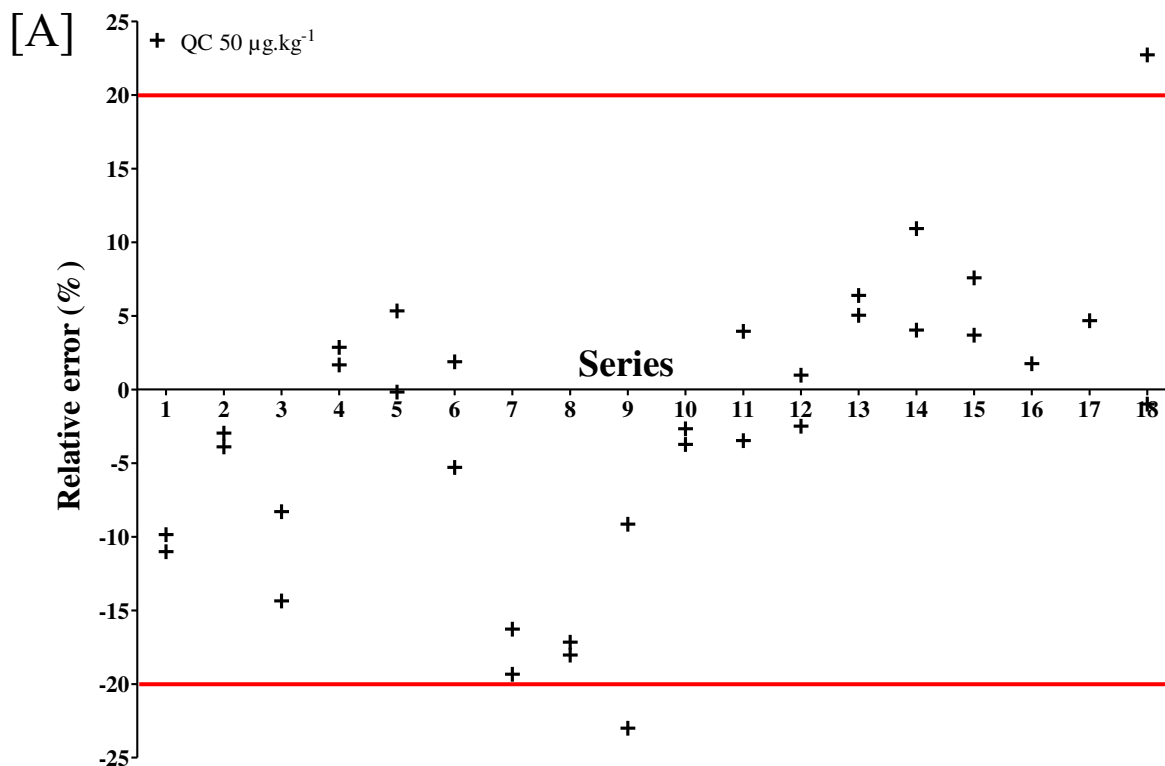
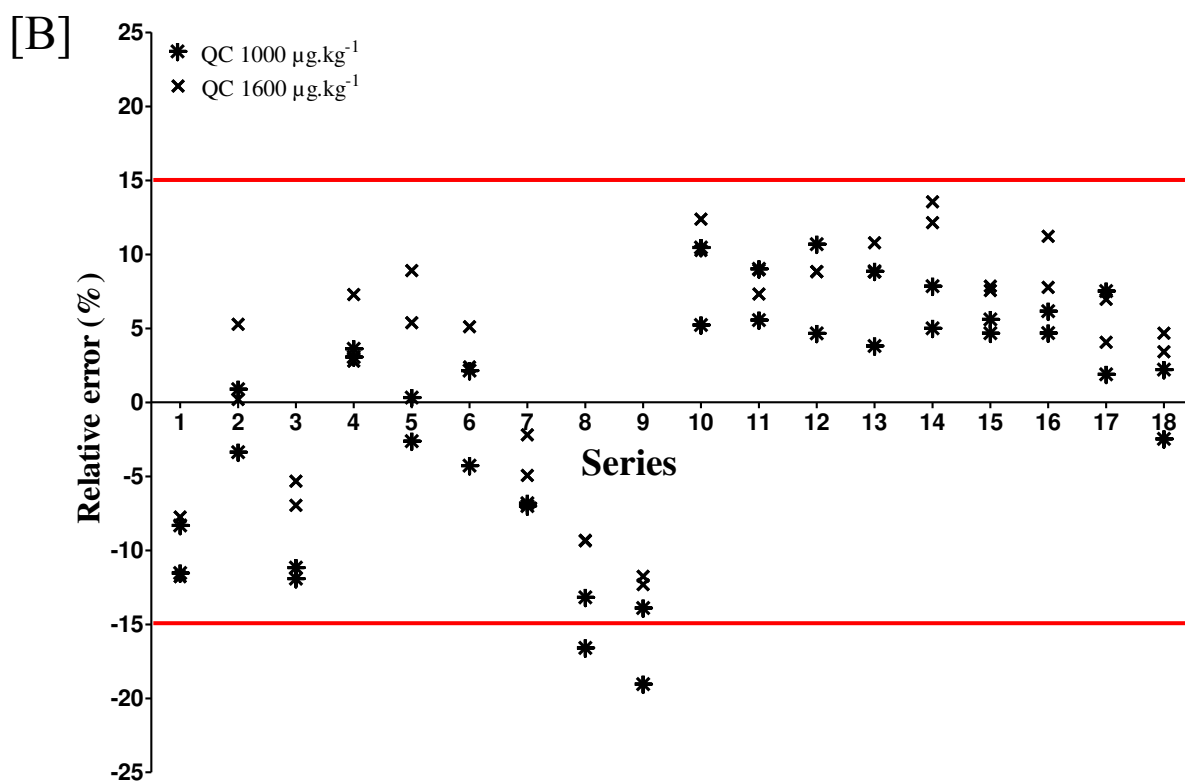


Fig. S2. Observed relative errors of QC samples used in routine assay

Observed relative errors (average of spiramycin and neospiramycin) of the six QC samples at 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [A], 1000 and 1600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ [B] concentration level obtained over the 18 runs of routine use that would have been obtained with the linear regression after logarithmic transformation. The solid red horizontal lines represent the $[-20\%, 20\%]$ acceptance limits for QC at 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ and $[-15\%, 15\%]$ acceptance limits for QC at 1000 and 1600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.



*Two QC outside the acceptance limits are not represented on the run 16 – 17 [A].



5.2. Développement d'un modèle PBPK générique et application au passage d'un antibiotique dans le lait de deux espèces de production

5.2.1. Introduction

Les modèles PBPK sont de plus en plus utilisés dans de nombreux domaines tels que l'évaluation des risques et le développement de médicaments. Ils se sont révélés être un outil prometteur pour fournir des estimations du temps d'attente (TA) des médicaments vétérinaires dans les denrées d'origine animale comme le lait (Lin *et al.*, 2016). Ces prédictions sont particulièrement importantes, étant donné l'existence de résidus dépassant les limites réglementaires autorisées (LMR pour limite maximale résiduelle), malgré l'abattage des animaux de production suivant le respect des délais de temps d'attente calculés à partir de méthodes statistiques établies il y a quelques décennies (Chevance, 2017; Henri *et al.*, 2017).

Peu de modèles PBPK décrivant l'excrétion lactée des xénobiotiques ont été développés ces dernières années (Li *et al.*, 2018; Woodward, Morin and Whitem, 2020) (voir section 2.5.3) afin de prédire des TA dans le lait. En outre, ces modèles sont difficilement extrapolables à d'autres xénobiotiques puisqu'ils estiment au moins un paramètre spécifique de la (ou des) molécule(s) étudiée(s). Ainsi, le développement d'un modèle PBPK générique et mécanistique permettant de prédire l'excrétion lactée de xénobiotiques dans le lait de plusieurs espèces animales a été développé dans cette thèse. L'application de ce modèle pour prédire le passage de l'oxytétracycline (OTC) dans le lait de deux espèces de production est présentée dans l'article ci-dessous.

5.2.2. Article soumis

Cet article a été soumis dans le **Food and Chemical Toxicology Journal**.

A Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) model to explore the blood-milk barrier in lactating species

Case study with oxytetracycline administered to dairy cow and goat

Jennifer Tardiveau^{1,2}, Lerica LeRoux-Pullen³, Ronette Gehring³, Gaël Touchais⁴, Marie Pierre Chotard-Soutif⁴, Hélène Mirfendereski^{1,5}, Carine Paraud⁶, Matthieu Jacobs^{7#}, Reynald Magnier⁷, Michel Laurentie⁴, William Couet^{1,2,5}, Sandrine Marchand^{1,2,5}, Alexis Viel^{4\$}, Nicolas Grégoire^{1,2,5\$*}

¹INSERM U1070, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France

²Université de Poitiers, UFR de Médecine Pharmacie, 6 rue de la Milétrie 86073 Poitiers Cedex, France

³Department of Population Health Sciences: IRAS Veterinary and Comparative Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 104, 3508 TD Utrecht, The Netherlands

⁴ANSES, Laboratoire de Fougères, 10B rue Claude Bourgelat, Bioagropolis, Javené 35306 Fougères, France

⁵CHU de Poitiers, département de toxicologie et pharmacocinétique, 2 rue de la Milétrie 86073 Poitiers Cedex, France

⁶ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, site de Niort, 60 rue de Pied de Fond 79024, Niort, France

⁷Ceva Santé Animale, Libourne I&D Center, 10 Avenue de la Ballastière, 33500 Libourne, France

[#]Present address: Servier, Quantitative Pharmacology department, 25 rue Eugène Vignat, 45000 Orléans, France

^{\$}These authors contributed equally

*To whom correspondence should be addressed: nicolas.gregoire@univ-poitiers.fr ; Address: 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France.

Abbreviations: AUC: area under the time concentration curve; BLQ: below the lower limit of quantification; C_{max}: maximal concentration; CV: coefficient of variation; EW: extracellular water; GSA: global sensitivity analysis; IIV: inter-individual variability; IM: intramuscular; IMI: inter-milking interval; IV: intravenous; IW: intracellular water; LLOQ: lower limit of quantification; MAPE: mean absolute percentage error; MP: milk to plasma ratio; MRL: maximum residue limit; OTC: oxytetracycline; PBPK: physiologically based pharmacokinetic;

PK: pharmacokinetic; PI : prediction interval; R^2 : coefficient of determination; RV: residual error; SAEM: stochastic approximation expectation-maximization; $T_{\max}$: time of the maximal concentration; ULOQ: upper limit of quantification; VASC: vascular space; VPC: visual predictive check ; WHO: World Health Organization; WP: withdrawal period.

1. Introduction

Understanding the passage of drugs into milk is important to manage residues in foodstuffs of animal origin in order to optimize the withdrawal period, both for food safety (limiting the risks for consumers), and for economic reasons, to avoid milk being discarded where drug residues are below the maximum residue limits (MRLs). To address these issues, it is essential to accurately predict the concentration of a molecule in milk over time.

After administration in an animal, the drug is absorbed, distributed and eliminated, following pharmacokinetics (PK) processes that depend on the physico-chemical properties of the compound and the physiology of the animal. The distribution in milk depends on the same PK processes, adapted to the particularities of the udder physiology and the composition of the milk. Milk is an emulsion of fat globules in an aqueous medium containing soluble proteins, casein and minerals. Compounds may be distributed in the different milk fractions (cream, curd, whey) depending on their lipophilicity, ionization and binding, as well as species and external factors such as milk composition, volume of milk produced and milking frequency (Hotham and Hotham, 2015; Ozdemir, 2018; Whitem, 2012).

Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models integrate the physico-chemical properties of drugs and the physiological parameters of species (Lin et al., 2016). In particular, it is possible with these models to predict a compound concentrations in various fluids and tissues after different dosing regimens. They can be of particular interest for predicting the excretion of compounds into milk of various species.

In veterinary medicine, several PBPK models have been developed in recent years. Most of them concern the prediction of tissues residues and withdrawal periods in farm animals for food safety assessment (Lautz et al., 2019). Few PBPK models describing the excretion of drugs into milk exist for dairy cows (Leavens et al., 2014; Li et al., 2018; Woodward and Whitem, 2019). At present there is no model for dairy goats or ewes.

Moreover, some essential factors affecting distribution in milk are not taken into account in the currently published models. For instance, excretion into milk was modeled as a simple first order elimination from plasma (Leavens et al., 2014) and did not account for udder size, composition and perfusion, or variation in the volume of milk produced and milking frequency (Abduljalil et al., 2021). Others models are more physiological and described the structure of the udder (Li et al., 2018; Woodward and Whitem, 2019) but they did not consider

permeability-limited passive diffusion and active transport within mammary cells and they do not describe the distribution in the different milk fractions or the binding of molecules to the different milk constituents.

Oxytetracycline (OTC) is a broad-spectrum antibiotic from the tetracycline family. It is widely used in veterinary medicine to treat infectious diseases (Craigmill et al., 2000). OTC PK is well known in multiple veterinary species (Aktas and Yarsan, 2017; Craigmill, 2003; Nouws et al., 1985b; Rule et al., 2001). Briefly, it has a good bioavailability in cattle after intramuscular (IM) injection, is distributed to most tissues and fluids such as milk. It is excreted unchanged mainly in the urine by glomerular filtration and tubular secretion and secondarily in the bile (Nouws et al., 1985b). Its off-label use led to various adverse effects at higher doses (in the kidneys and liver) as well as violative residues in edible tissues (Riad et al., 2021). The published OTC PK studies have resulted in the development of PBPK models of OTC in non-lactating food animal species such as cattle (Achenbach, 1998), sheep (Craigmill, 2003), sheep and goat (Riad et al., 2021) as well as in dog (Lin et al., 2015) and salmon (Law, 1999), for different formulations. To our knowledge, however, there is no PBPK model to predict OTC distribution in milk.

The objective was to build a PBPK model that could be used to predict the excretion of different compounds in the milk of various animal species and even in humans. We therefore chose to develop a rather detailed PBPK model, which could be adapted to the data available for these different compounds and species.

The generic PBPK model thus developed was then applied in a case study to predict OTC concentrations in cow and goat milk.

2. Materials and methods

OTC plasma and milk concentrations in cow and goat were obtained experimentally prior to the development of the PBPK model in order to calibrate and/or validate this model. *In vitro* permeability studies in a Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) were performed to calibrate the (transcellular) passive diffusion of OTC from plasma to milk. In the following paragraphs, we will first present the experimental studies (properties of OTC, animal study, *in vitro* experimentation, and analytical methods), then the development of the PBPK

model (the global structure, the udder and milk model) and finally the calibration and validation of the model.

2.1. Experimental studies

2.1.1. Chemicals

All chemicals used in analytical assays were of analytical grade.

OTC in hydrochloride form (Terramycine solution injectable®; Zoetis, Malakoff, France) was used for the *in-vivo* experiments. Its octanol-water partition coefficient (logP) and its pKa were determined from Chemicalize (“Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions,” n.d.). The logP of OTC was estimated to be -4.54.

OTC has several chemical groups which, depending on the pH, may have an electrical charge. The 2 main groups of OTC that can have an electric charge in physiological pH (~7) have an acid pKa of 7.25 and a basic pKa of 5.80, respectively. According to Rodgers and Rowland’s publications (Rodgers et al., 2005; Rodgers and Rowland, 2006), OTC was considered as a zwitterion of group 2 since it has no basic pKa ≥ 7 . The ionisation ratios of OTC in the different media were calculated from the equations reported by Rodgers and Rowland (Rodgers et al., 2005; Rodgers and Rowland, 2006).

2.1.2. Animals

Six Prim’ Holstein cows as well as five Alpine and one crossbreed goats were included in the study which had been approved by the Animal Research Ethics Committee (APAPHIS n° 19369-2019022111373719). Each animal received a drug-free diet and water *ad libitum*. All animals were free of clinical mastitis. Goats and cows were milked twice a day: at 8h and 16h, meaning a milking interval of 8 hours during the day and of 16 hours during the night, by a milking unit and a milking robot, respectively. Each animal received a single dose of OTC conventional formulation at 10 mg.kg⁻¹ by intramuscular (IM) route in the neck, at several injection points. Blood samples were taken from jugular vein by venipuncture at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and 8-hours post-administration and then, twice a day up to 4 days post-administration. Within 30 min after sampling, blood samples were centrifuged at 3500 rpm at room temperature for 10 minutes and plasma were collected. Milk samples (about 20 mL) mixed from all the teats (4 for

cows, 2 for goats) were taken at each milking starting at 8 hours post-administration and continued up to 5 days. The volumes of milk collected were measured at each milking. The butyrous and protein rates were quantified once for each individual's milk at the beginning of the experiment. The demographic characteristics of the animals are presented in the **Table S1 of the supplementary materials**.

Blank samples of blood and milk (without drug) were collected before administration. All samples were frozen and stored at -20°C and protected from light until analysis.

2.1.3. PAMPA experiments

The PAMPA, as first described by Kansy *et al*, was used as an *in vitro* model of passive transcellular permeation (Kansy et al., 1998). PAMPA was performed using the Corning® Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System. This plate system consisted of pre-coated inserts of structured layers of phospholipids, composed of hexadecane in hexane (5 % v/v). The PAMPA protocol published by Corning® (Chen et al., 2008), with minor adaptations, was performed as follows: stock solution of 10mM OTC in DMSO was prepared and further diluted in PBS to a final concentration of 200 µM (100 mg/L). A volume of 300 µL of solution was added to each well of the receiver plate and 200 µL of PBS were added to the pre coated filter plate's wells. The plate was then incubated for four hours at room temperature, without agitation. After the incubation period, two 100 µL samples were collected from each well and stored at -80°C until analysis.

After analytical analysis of the samples, the apparent permeability of OTC over the synthetic membrane was calculated using the following formula (Equation 1) (Shanler et al., 2021):

$$P_{app} = \frac{-\ln\left(\frac{1-C_A(t)}{C_{eq}}\right)}{A \times \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) \times t} \quad (1)$$

$$\text{with } C_{eq} = \frac{C_D(t) \times V_D + C_A(t) \times V_A}{V_D + V_A}$$

where A is the filter area (0.3 cm²), V_D is the donor well volume (0.3 mL), V_A is the acceptor well volume (0.2 mL), t is the incubation time (in seconds), C_A(t) is the compound concentration in acceptor well at time t, C_D(t) is the compound concentration in donor well at time t, C_{eq} corresponds to the concentration at equilibrium.

2.1.4. Analytical Methods

Plasma samples were assayed by Shimadzu high-performance liquid chromatography system (Shimadzu, SBM-20A, Marne la Vallée, France) coupled with an ultraviolet detector (Shimadzu, SDP-20A). A volume of 100 μ L of plasma sample was mixed with 50 μ L of internal standard solution: demeclocycline hydrochloride at 12 μ g/ml in trichloroacetic acid 10% and centrifuged for 10 min at 14000 rpm at about 7°C. Supernate was transferred into a vial with a polypropylene insert and 20 μ L of the solution were injected into the chromatographic system. The analytical column was a Luna Omega Polar C₁₈ (150 * 2.1 mm, 5 μ m), fitted with a Luna Omega C₁₈ precolumn (4 x 2.0mm) (Phenomenex, Torrance, California, USA). The mobile phase was composed of KH₂PO₄ solution at 0.025 mol/L and pH 3.0 (adjusted with phosphoric acid), and an acetonitrile solution (90:10 [vol/vol]) and was delivered isocratically at 0.3 mL/min. Rinsing of the needle with 100 μ L of a methanol/water/isopropanol/acetonitrile mixture (25:25:25:25) was done between each injection and repeated rinsing of the system with ACN and HPLC grade water in gradient mode was used at the end of the run. The UV detection was at 355 nm. The retention time was 8 min for OTC and 14 min for the internal standard. The lower and upper limits of quantification (LLOQ and ULOQ) of the method were 0.05 μ g/mL and 15 μ g/mL, respectively. The trueness and precision were characterized at five concentration levels (0.05, 0.2, 6, 10, 15 μ g/ml) with a relative bias between -7.1% and 5.8% for goat; -5.1% and 10.2% for cow; a repeatability between 0.1% and 2.0% for goat; 0.6% and 3.1% for cow; and an intermediary precision between 1.5% and 3.0% for goat; 1.0% and 5.4% for cow.

The analytical method used to assay PAMPA samples in PBS was slightly adapted from the method in plasma by using a quadratic regression instead of linear regression for calibration.

Milk samples were assayed by LC-MS/MS. Two (2) g of milk sample were mixed with 1 mL of water (HPLC grade). A volume of 200 μ L of internal standard solution, demeclocyclin hydrochloride at 1 μ g/ml was added, and the mixture was vortexed and left for at least 10 minutes from the light. Extraction was made by adding 10 mL of Mac Ilvaine/EDTA buffer, vortexed during 30 secondes, shaken with a rotary stirrer at 100 rpm during 10 min and centrifuged 10 min at 14000 g at 4°C. Deproteination was made by adding 1 mL of TCA at 1 g/mL, vortexed, frozen for 15 min and centrifuged 5 min at 14000 g. Purification was made by

solid phase extraction (SPE) using Bond Elut C18 cartridges (200 mg/3cc - Agilent Technologies) and elution by oxalic acid solution at 0.01 mol/L before filtration with 0.45 μm filter. Five (5) μL were injected into the chromatographic system composed of Quadrupole tandem mass spectrometer: type TSQ Vantage (Thermo Scientific) with data acquisition station: Xcalibur version 2.2.SP1. The analytical column was a Kinetex® Biphenyl C₁₈ (100 x 2,1 mm, 2.6 μm) (Phenomenex, Torrance, California, USA). The mobile phase A was a formic acid solution at 0.2% in water, and mobile phase B was a formic acid solution at 0.2% in methanol. The gradient for mobile phase B was set at 5%, 98%, and 5% at 0.01, 5, and 6.1 min, respectively, with a flow rate of 0.35 mL.min⁻¹. Heated-electrospray ionization (H-ESI) in positive mode was used for the detection of OTC. Ions were analyzed in the multiple reaction monitoring, and the following transitions were inspected: 461.1 $m/z \rightarrow [M+H]^+ > 426.16 m/z$ and 465.1 $m/z \rightarrow [M+H]^+ > 448.10 m/z$ for OTC and IS, respectively. The retention time was 4.4 min for OTC and 4.8 min for the internal standard. The lower and upper limits of quantification of the method were 20 $\mu\text{g/kg}$ and 1000 $\mu\text{g/kg}$ (0.2 to 10 times the MRL), respectively. The trueness and precision were characterized at six concentration levels (20, 40, 100, 300, 500, 1000 $\mu\text{g/kg}$) with a relative bias between -0.1% and 1.8% for goat; -3.2% and 3.7% for cow; a repeatability between 0.5% and 1.7% for goat; 1.0% and 1.6% for cow; and an intermediary precision between 3.3% and 4.8% for goat; 1.0% and 4.8% for cow.

2.2. Global PBPK Model Structure

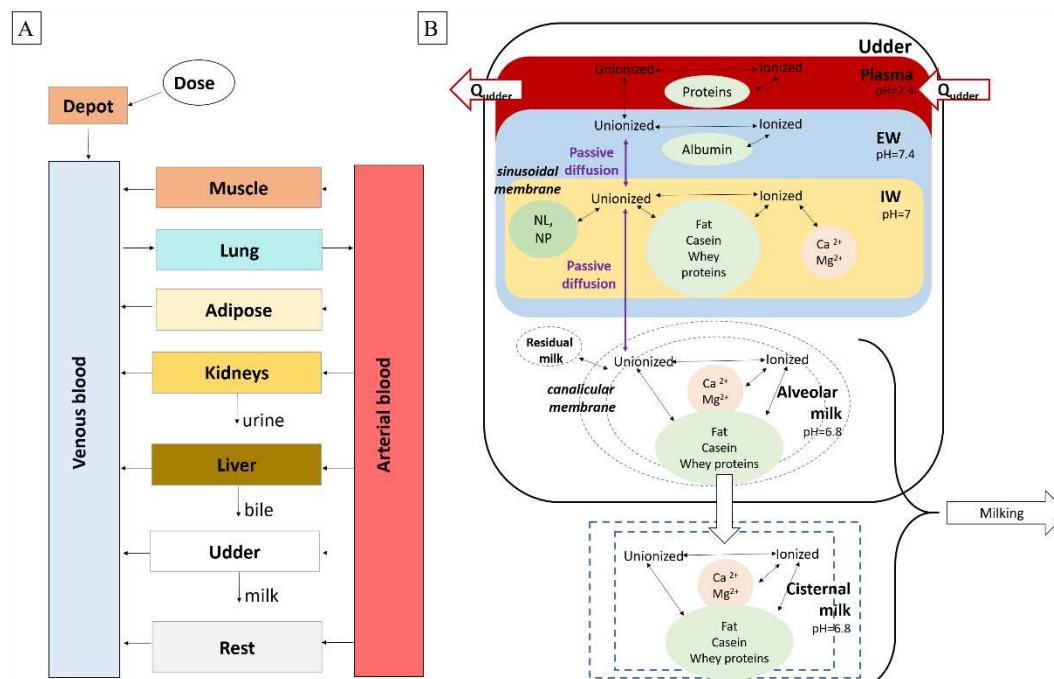


Figure 1: (A) Schematic diagram of the whole PBPK model to explore the blood-milk barrier in lactating species. Intramuscular (IM) administration was considered through the depot compartment. Rest compartment was composed of remaining organs with no specific interest. (B) Schematic representation of the udder sub-compartments. The udder was described as a multi-compartment permeability-limited model, composed of an interstitial space consisting of extracellular water (EW), an intracellular water (IW) and the milk which is produced in the udder alveolar cells (alveolar milk) and stored in the cistern (cisternal milk). Passive diffusion between sub-compartments and binding to several proteins (casein, whey proteins), lipids (NL for neutral lipids, NP for neutral phospholipids and ions (Ca^{2+} for calcium, Mg^{2+} for magnesium) were considered.

The PBPK model was composed of ten compartments corresponding to the main body organs and tissues (lung, adipose, muscle), blood compartments (arterial and venous), absorption compartment (depot), excretory organs (kidneys, liver), tissue of interest (udder, see section 2.3) and a lumping compartment for the rest of the body (Figure 1A). All compartments, interconnected by blood flows, were defined by a volume and a blood flow rate obtained from published experimental studies with healthy animals for each species (see **Table S2 in supplementary materials**). The distribution of OTC from the plasma to the tissues was considered as perfusion limited, consistent with previous PBPK models of OTC in cattle, sheep and goat (Craigmill, 2003; Riad et al., 2021). A more detailed model was developed for the udder, taking into account the permeability data generated *in vitro* (see section 2.1.3).

The IM absorption was modelled by a single depot compartment connected to the venous blood compartment by an intramuscular absorption rate (k_{IM}) (Equation 2).

$$\frac{dA_{depot}}{dt} = -k_{IM} \times A_{depot} \quad (2)$$

with A_{depot} the drug amount in the depot compartment, calculated as $A_{depot} = dose \times F_{IM}(\%)$ and F_{IM} the intramuscular bioavailability. For each species, k_{IM} value was estimated by fitting the PBPK model with experimental plasma data from the current study (see section 2.4), whereas F_{IM} value was obtained in the literature (Nouws et al., 1985b; Rule et al., 2001) (see Table 1).

Drug partition between blood and plasma was based on the blood to plasma ratio (BP, **see details in section 2.2.2 of the supplementary materials**) and used to convert plasma concentrations to blood concentrations.

Drug distribution depended on the tissue to plasma partition coefficient (k_{tissue}) for each tissue, defined as the ratio between total tissue drug concentration and total plasma concentration (Yau et al., 2020). The k_{tissue} values were obtained in the literature from OTC tissue and serum residues in sheep (Craigmill, 2003), except the one for lungs which was estimated from residues data in cow (Achenbach, 1998), (**see details in section 2.2.3 of the supplementary material**) (see Table 1). For the lumping compartment, the partition coefficient (k_{rest}) was calculated as the weighted mean of the partition coefficients of the lumped organs (Equation 3) (Nestorov et al., 1998). As partition coefficients were missing for these lumped tissues, the partition coefficient of the muscle was used for poorly perfused tissues (bones, carcass, heart, pancreas, spleen) and the partition coefficient of the kidney was used for richly perfused tissues (brain and gastrointestinal tracts) (Lin et al., 2015).

$$k_{rest} = \frac{k_{muscle} \times V_{poorly_perfused} + k_{kidneys} \times V_{richly_perfused}}{V_{poorly_perfused} + V_{richly_perfused}} \quad (3)$$

where $V_{poorly_perfused} = V_{GItract} + V_{Intestines} + V_{Brain}$

and $V_{richly_perfused} = V_{Bones} + V_{Carcass} + V_{Heart} + V_{Pancreas} + V_{Spleen}$

With k_{muscle} and $k_{kidneys}$ the tissue to plasma partition coefficient of the muscle and kidneys, and V_{tissue} the volume of tissue.

Distribution of drug in the non-eliminating organs was described by the following equation (Equation 4):

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = Q_{tissue} \times \left(C_{art} - \frac{C_{tissue}}{k_{tissue}} \times BP \right) \quad (4)$$

with A_{tissue} the amount of drug in tissue, Q_{tissue} the tissue blood flow rate, C_{art} and C_{tissue} the concentration of drug in arterial blood and tissue, respectively, BP the blood to plasma ratio and k_{tissue} the tissue to plasma partition coefficient.

OTC total plasma clearance values (CL_{plasma}) for both species were obtained by averaging values reported in several articles for cows (Craigmill et al., 2004; Nouws et al., 1985b) and goats (Aktas and Yarsan, 2017; Rule et al., 2001) (see Table 1). These clearances were split between renal and hepatic clearances only based on the unchanged excreted fraction in urine ($fe_{kidneys}$) reported in the literature (Nouws et al., 1985b) (see Table 1). The excretion clearance in milk was considered independently of the systemic clearance (see section 2.3). The differential equation describing the variation in the amount of OTC in the eliminating organs (liver and kidney) was of the form (Equation 5):

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = Q_{tissue} \times \left(C_{art} - \frac{C_{tissue}}{K_{tissue}} \times BP \right) - Q_{tissue} \times ER_{tissue} \times C_{art} \quad (5)$$

with ER_{tissue} the extraction ratio of the corresponding tissue.

Extraction ratio of both organs were calculated based on CL_{plasma} and $fe_{kidneys}$ as follows (Equations 6 and 7):

$$ER_{blood,kidneys} = \frac{CL_{plasma} \times fe_{kidneys}}{BP \times Q_{kidneys}} \quad (6)$$

$$ER_{blood,liver} = \frac{CL_{plasma} \times (1 - fe_{kidneys})}{BP \times Q_{liver}} \quad (7)$$

2.3. Udder and Milk Model

The udder was described as a multi-compartment permeability-limited model (Figure 1B). It was composed of a vascular space (VASC), an interstitial space consisting of extracellular water (EW), an intracellular water (IW) of mammary epithelial secretory cells and 2

compartments containing the milk. Between each milking, milk components were produced within the epithelial secretory cells (alveolar milk), then passed the canalicular membrane and reached the cistern (cisternal milk) through the ductules.

We hypothesized that only the unbound and unionized form of the drug diffused passively between EW and IW and between IW and alveolar milk. The fraction of ionized OTC in each sub-compartment was calculated based on the pH of these compartments and the pKas of OTC, and the diffusion rate between EW and IW and between IW and alveolar milk was estimated based on *in vitro* PAMPA results. In IW as in milk, OTC was supposed to distribute between the fat and aqueous fraction and to bind to casein, whey proteins, ionized calcium and magnesium.

2.3.1. Permeability

Passive diffusion, the main mechanism of OTC distribution into the milk, was assessed by PAMPA experiments (Fujikawa et al., 2005) as detailed in section 2.1.3. This synthetic membrane allowed us to estimate a permeability (P_{app} in cm/s) (see Table 1) representing transcellular diffusion that could be applied to sinusoidal and canalicular membranes. P_{app} was converted to passive milk clearance (CL_{diff} in L/h) according to the following equation (Badhan et al., 2014) (Equation 8):

$$CL_{diff} = P_{app} \times SA \times Tissue\ weight \quad (8)$$

where SA represented *in vivo* endothelial surface area (cm²/g) and tissue weight represented the weight of the udder (g).

SA was not found in the literature for udder of cow or goat; therefore, it was calculated considering the cylindrical structure of capillary from geometric formula (Ng and Hungerbühler, 2013) (see **section 2.3.1 of the supplementary materials for calculation details**).

2.3.2. Extracellular water

In both the EW and the VASC, the pH was considered to be 7.4 (Rodgers et al., 2005) (see Table 1), so the two spaces were supposed to be in instantaneous equilibrium. The ratio between the total EW concentration and the total blood concentration in the tissue vascular space ($K_{EW/B}$) was used, allowing that only one differential equation was enough to determine concentrations of OTC in VASC and EW (Jamei et al., 2014).

In addition, OTC was supposed to bind to albumin in EW. Albumin concentration in EW was found in the literature (Vestweber and Al-Ani, 1984) (see Table 1) and its affinity constant for OTC was calculated based on the unbound fraction in plasma (see **section 2.3.2.1 of the supplementary materials, equation S20**) (Rodgers and Rowland, 2006).

The variations of the amount of drug in the EW (A_{EW}) was described by the following equation (Equation 9):

$$\frac{dA_{EW}}{dt} = Q_{udder} \times C_{art} - Q_{udder} \times \frac{Cu_{EW}}{fu_{EW}} \times \frac{1}{K_{EW/B}} + CL_{diff,sin} \times \left(\frac{Cu_{IW}}{X} - \frac{Cu_{EW}}{Y} \right) \quad (9)$$

with

$$Cu_{EW} = \frac{A_{EW}}{V_{EW,eff}} \times fu_{EW}; \quad V_{EW,eff} = V_{EW} + \frac{V_{VASC}}{K_{EW/B}};$$

$$V_{EW} = f_{EW} \times V_{udder}; \quad V_{VASC} = f_{VASC} \times V_{udder}$$

where fu_{EW} is the EW unbound fraction, X and Y are the ionization ratio of OTC in IW and EW, respectively; $K_{EW/B}$ is the quotient of total EW concentration and the total blood concentration in the tissue vascular space (VASC); $CL_{diff,sin}$ is the clearance pertaining passive diffusion of drug across the sinusoidal membrane; Cu_{EW} is the unbound concentration in EW; Cu_{IW} is the unbound concentration in IW; f_{vasc} and f_{EW} are vascular and EW fractions, $V_{EW,eff}$ is the volume of effective extracellular space which is a combination of EW and VASC; V_{EW} , V_{VASC} and V_{udder} are EW, vascular and udder volumes, respectively.

Details for calculations of X, Y, fu_{EW} and $K_{EW/B}$ were presented in **section 2.3.2 of the supplementary materials**.

2.3.3. Intracellular water

In IW the pH was considered to be 7.0 (Rodgers et al., 2005) (see Table 1). Unionized OTC was assumed to bind to neutral lipids and phospholipids. Concentration of neutral lipids and neutral phospholipids were fixed based on available information in the literature (Kinsella and McCarthy, 1968) (Larson, 1978). Their OTC affinity constants were calculated based on the drug lipophilicity (logP) and ionization rate in IW (X) following Rodgers and Rowland's equations (Rodgers et al., 2005; Rodgers and Rowland, 2006) (see section 2.3.2.2 of the supplementary material).

In addition, the IW compartment was supposed to contain the same components as the milk, *i.e.*, fat, casein, whey proteins (lactalbumin and lactoglobulin) and ionized calcium and magnesium. OTC was supposed to distribute and bind to these components in IW as in milk.

Concentration of milk fat, casein and whey proteins in IW were assumed to be identical to those in milk and were described in section 2.3.4.2. The concentration of ionized magnesium in IW was found in the literature (Martens and Stumpff, 2019). The concentration of ionized calcium in IW was calculated based on the total concentration of calcium in IW (Neville and Watters, 1983) and the free calcium fraction in IW that was supposed to be the same as in milk (7%, see section 2.3.4.2). Calculations of their OTC affinity constants are detailed in section 2.3.4.2.

The variation of the amount of drug in the IW (A_{IW}) was described by the following equation (Equation 10):

$$\frac{dA_{IW}}{dt} = CL_{diff,sin} \times \left(\frac{Cu_{EW}}{Y} - \frac{Cu_{IW}}{X} \right) + CL_{diff,can} \times \left(\frac{Cu_{alveolar\ milk}}{Z} - \frac{Cu_{IW}}{X} \right) \quad (10)$$

with

$$Cu_{IW} = \frac{A_{IW}}{V_{IW}} \times fu_{IW} ; V_{IW} = f_{IW} \times V_{udder}$$

where fu_{IW} is the IW unbound fraction, Z is the ionization ratio of OTC in milk; $CL_{diff,can}$ is the passive diffusion of drug across the canalicular membrane; f_{IW} is the intracellular water fraction; V_{IW} is the volume of udder intracellular water; $Cu_{alveolar\ milk}$ is the unbound concentration in alveolar milk space.

Details for calculations of Z and f_{uIW} are presented in **section 2.3.2.2 of the supplementary materials**.

2.3.4. Milk

2.3.4.1. Production of milk

Milk is produced by the mammary epithelial secretory cells, exported into the alveolar lumen and transported by the ductules to the cistern where it is stored. The volume of milk contained in the udder ($V_{milk,tot}$) is splitted with 70% ($f_{alveolar}$) (see Table 1) in the alveolar space (the alveolar lumen plus the ductules and the residual, see below) and 30% ($1-f_{alveolar}$) in the cistern (Ayadi et al., 2003; Caja et al., 2004).

In cows, at each milking, the volume of milk collected ($V_{milk,obs}$) corresponded to 95% ($1-f_{residual}$) of $V_{milk,tot}$ while 5% ($f_{residual}$) remains in the alveolar space ($V_{residual}$) (Whittem, 2012), whatever the value of inter-milking interval (IMI). In goat, $f_{residual}$ was considered to be 13% for an IMI of 16h and 19% for an IMI of 8h (Peaker and Blatchford, 1988).

In the current PBPK model, the volume of milk produced over a milking interval ($V_{milk}(t)$) used to compute the milk concentrations over time, was supposed to increase linearly with time, until reaching the $V_{milk,obs}$ at the end of the milking interval (*i.e.*, when $t = IMI$). We defined the volume of the available alveolar milk (milk volume of alveolar space and ductules, minus the residual milk) $V_{alveolar}$ and the volume of the cisternal milk $V_{cisternal}$ so that $V_{milk,tot}$ is the sum of alveolar, cisternal and residual milk volumes (*i.e.*, $V_{milk,tot} = V_{alveolar} + V_{residual} + V_{cisternal}$).

Linear production of V_{milk} , $V_{alveolar}$ and $V_{cisternal}$ were described in the following equations (Equations 11-13):

$$V_{milk}(t) = (1 - f_{residual}) \times V_{residual} + t \times \left(\frac{V_{milk,obs} - (1 - f_{residual}) \times V_{residual}}{IMI} \right) \quad (11)$$

where $f_{residual}$ is the fraction of residual milk; $V_{residual}$ is the volume of milk remaining in the udder after the previous milking, t represents the time since the last milking, $V_{milk,obs}$ the volume of milk collected at each milking and IMI the inter-milking interval (8 or 16h).

Then,

$$V_{milk,tot}(t) = \frac{V_{milk}(t)}{1 - f_{residual}}$$

Hence,

$$V_{alveolar}(t) = (f_{alveolar} - f_{residual}) \times V_{milk,tot}(t) \quad (12)$$

$$V_{cisternal}(t) = (1 - f_{alveolar}) \times V_{milk,tot}(t) \quad (13)$$

2.3.4.2. Drug distribution in udder and milk

In the milk, the pH was assumed to be 6.68 for cow and 6.65 for goat (Park et al., 2007) (see Table 1). As described above, in milk, OTC is distributed within fat and aqueous phase and bound to casein, whey and ionized calcium and magnesium.

Milk concentrations of fat, casein and whey proteins were calculated based on experimental measured butyrous and protein rates (see **Table S1 in supplementary materials**). The concentration of fat (g/L) was determined by multiplying the butyrous rate measured (g/kg) by the density of milk (kg/L) (Park et al., 2007). The total milk proteins concentration (g/L) was determined by multiplying the protein rate measured (g/kg) by the density of milk. The concentrations of casein and whey proteins were calculated according to their respective proportions in the milk of each species, *i.e.* 88/12% for cows and 65/35% for goats (Balthazar et al., 2017).

The percentage of free magnesium in milk (16%) was obtained in the literature (Oh and Deeth, 2017) and multiplied by the total concentration of magnesium in milk of each species (Balthazar et al., 2017) to obtain the ionized concentration of magnesium (see Table 1). The percentage of free calcium in milk was estimated in cow's milk based on the ratio of free calcium concentration (Neville and Watters, 1983) to total calcium concentration (Balthazar et al., 2017). Due to missing values for free calcium concentration in other species, this percentage in cow was multiplied by the total calcium concentration in milk of each species (Balthazar et al., 2017) to obtain the ionized calcium concentration (see Table 1).

Affinity constants for fat ($k_{a_{fat}}$) and casein ($k_{a_{casein}}$) were estimated from the measures of milk distribution of 15 drugs, published by Shappell and Lupton (Lupton et al., 2018; Shappell et al., 2017). The $k_{a_{fat}}$ and $k_{a_{casein}}$ of each drug was calculated as the ratio of the concentration in fat -or the concentration bound to casein- to the free concentration in milk (total concentration in milk multiplied by the free fraction in milk). Then a linear regression was built between the

logarithm of ka_{fat} and the distribution coefficient ($\log D$) of each drug ($R^2 = 0.83$) (Equation 14) and another between the logarithm of ka_{casein} and the distribution coefficient of each drug ($R^2 = 0.80$) (Equation 15). Finally, the ka_{fat} and ka_{casein} of OTC in milk and IW were calculated based on the $\log D$ of OTC using these equations.

$$\log(ka_{fat}) = 0.49 \times \log D - 3.112 \quad (14)$$

$$\log(ka_{casein}) = 0.29 \times \log D - 2.09 \quad (15)$$

with $\log D = \log P - \log X$ for IW

$\log D = \log P - \log Z$ for milk

Affinity constant of OTC for whey proteins (ka_{whey}) was found in the literature (Shappell et al., 2017).

The affinity constants of OTC for calcium ($ka_{Ca^{2+}}$) and magnesium ($ka_{Mg^{2+}}$) were estimated based on the results of Carlotti *et al* (Carlotti et al., 2012). Similarly to fat and casein, a linear regression was built between the logarithm of OTC affinity constant for both metal ions ($ka_{ion^{2+}}$ in L/mol) and the pH ($R^2 = 0.99$) (Equation 16). Thus, the $ka_{Mg^{2+}}$ and $ka_{Ca^{2+}}$ were converted in L/g by dividing $ka_{ion^{2+}}$ by the molecular weight of each metal ion and calculated as a function of the pH of IW or milk.

$$\log(ka_{ion^{2+}}) = 0.7085 \times \text{pH} - 2.0478 \quad (16)$$

where $ka_{ion^{2+}}$ is in L/mol and pH is the pH of IW (7.0) or milk (6.68 for cow, 6.65 for goat).

Hence, the unbound fraction in milk was defined in equation 17 :

$$fu_{milk} = \frac{1}{(1 + ka_{fat} \times [fat] + ka_{casein} \times [casein] + ka_{whey,prot} \times [whey,prot] + ka_{Mg^{2+}} \times [Mg^{2+}] + ka_{Ca^{2+}} \times [Ca^{2+}])} \quad (17)$$

See calculation details in **section 2.3.2.3 of the supplementary materials**.

The amount of drug in the alveolar ($A_{alveolar}$) and cisternal ($A_{cisternal}$) milk were described by the following equations (Equations 18- 19):

$$\frac{dA_{alveolar\ milk}}{dt} = CL_{diff,can} \times \left(\frac{Cu_{IW}}{X} - \frac{Cu_{alveolar}}{Z} \right) - Q_{cistern} \times C_{alveolar} \quad (18)$$

$$\frac{dA_{cisternal\ milk}}{dt} = Q_{cistern} \times C_{alveolar} \quad (19)$$

with $Q_{cistern} = (1 - f_{alveolar}) \times \frac{V_{milk,obs}}{IMI}$; $Cu_{alveolar} = \frac{A_{alveolar}}{V_{alveolar}} \times fu_{milk}$

where $CL_{diff,can}$ is the passive diffusion clearance across the canalicular membrane, X and Z the ionization ratio in IW and alveolar milk, $Q_{cistern}$ the flow of milk from alveoli to cistern, $C_{alveolar}$ the OTC concentration in the alveolar milk, C_{uIW} and $C_{u_{alveolar}}$ the OTC free concentration in IW and alveolar milk, $f_{u_{milk}}$ the unbound fraction of OTC in milk, $f_{alveolar}$ is the fraction of alveolar milk and $V_{alveolar}$ is the volume of alveolar milk.

Finally, concentration in milk used for PBPK model predictions over time (Equation 20) was calculated as the sum of alveolar and cisternal amounts of OTC divided by $V_{milk}(t)$, as defined in Equation 11.

$$C_{milk}(t) = \frac{A_{cisternal}(t) + A_{alveolar}(t)}{V_{milk}(t)} \quad (20)$$

Parameters usually used to describe and evaluate the passage of a molecule into milk, such as the milk to plasma ratio (M/P) (Equation 21), the milk clearance (CL_{milk}) (Equation 22) and the percentage of the dose excreted in milk were calculated.

$$M/P = \frac{AUC_{0-t,milk}}{AUC_{0-t,plasma}} \quad (21)$$

$$CL_{milk} = \frac{A_{excreted}}{AUC_{96h,plasma}} \quad (22)$$

With AUC_{0-t} the area under the curve of milk or plasma total OTC concentrations over time (t) and $A_{excreted}$ the total amount of OTC excreted in milk as predicted by the model.

Table 1: Parameter Values Used in the PBPK Model. Parameters in g/kg in the literature were converted to g/L using udder density (1.06 kg/L) (Upton, 2008) or milk density (1.031 kg/L for cow, 1.034 kg/L for goat) (Park et al., 2007). One value per row means that the same value was used for both species. The parameters identified by an asterisk were evaluated in the global sensitivity analysis (see section 2.6).

Parameter	Abbreviation	Cow	Goat
Species physiology			
Alveolar fraction *	f_{alveoli}		0.7 ¹
Blood cells pH *	pH _{BC}		7.22 ²
Plasma pH *	pH _P		7.4 ²
Udder extracellular water pH *	pH _{EW}		7.4 ²
Udder intracellular water pH *	pH _{IW}		7.0 ²
Milk pH *	pH _{milk}	6.68 ³	6.65 ³
Udder vascular fraction *	f_{VASC}		0.12 ⁴
Udder extracellular water fraction *	f_{EW}		0.44 ⁵
Udder intracellular water fraction *	f_{IW}		0.24 ⁵
Udder neutral lipid fraction *	f_{NL}		0.0120 ^a
Udder neutral phospholipid fraction *	f_{NP}		0.0094 ^a
Plasma albumin (g/L) *	alb _P	30.81 ⁶	31.80 ⁷
Udder extracellular albumin (g/L) *	alb _{EW}		14.52 ⁸
Udder intracellular calcium (g/L) *	Ca ²⁺ _{IW}		0.0114 ^{9,10}
Udder intracellular magnesium (g/L) *	Mg ²⁺ _{IW}		0.024 ¹¹
Milk calcium (g/L) *	Ca ²⁺ _{MILK}	0.08 ^{9,10}	0.0931 ^{9,10}
Milk magnesium (g/L) *	Mg ²⁺ _{MILK}	0.018 ^{10,12}	0.024 ^{10,12}
Molecule parameters			
Compound type		Zwitterion of group 2 ¹³	
pKa of acid function *	pKa _{Acid}		7.25 ¹⁴
pKa of basic function *	pKa _{Base}		5.80 ¹⁴
Partition coefficient between octanol and water *	logP		-4.54 ¹⁴
Fraction unbound in plasma *	f_{up}	0.81 ¹⁵	0.80 ^b
Intramuscular bioavailability *	F_{IM}	0.88 ¹⁶	0.92 ¹⁷
Intramuscular absorption rate (1/h) *	k_{IM}	0.17 ^c	0.45 ^c
Total plasma clearance (L/h/kg) *	CL _{plasma}	0.09 ^d	0.14 ^c
Dose fraction excreted unchanged in the urines	$f_{\text{e kidneys}}$		0.85 ¹⁸
Blood to plasma ratio	BP	0.87 ^f	0.89 ^f
Partition coefficient	Muscle *	k_{muscle}	0.90 ¹⁹
	Lung *	k_{lung}	2.30 ²⁰
	Kidneys *	k_{kidneys}	6.62 ¹⁹
	Liver *	k_{liver}	1.87 ¹⁹
	Adipose *	k_{fat}	0.09 ¹⁹
	Lumping	k_{rest}	1.41 ^g
Udder permeability			
Capillary radius (mm) *	r		0.0025 ²¹
Udder blood flow fraction to lobules *	$f_{\text{VASC Lobules}}$		0.98 ²²
PAMPA permeability (cm/s) *	Papp		1.4 * 10 ⁻⁷ ^h

^a Calculation based on lipids repartition of Kinsella *et al* (Kinsella and McCarthy, 1968) and total phospholipid concentration of Bruce *et al* (Larson, 1978).

^b This value is the average of unbound fraction of cows and sheeps from Ziv *et al* (Ziv and Sulman, 1972).

^c These values were estimated by fitting the PBPK model with experimental plasma data (see section 2.2).

^d This value is the average between plasmatic clearance of the empirical model of Craigmill *et al* (Craigmill *et al.*, 2004) and Nouws *et al* (Nouws *et al.*, 1985b).

^e This value is the average between plasmatic clearance from Aktas *et al* (Aktas and Yarsan, 2017) and Rule *et al* (Rule *et al.*, 2001).

^f See calculation details in Supplementary Material.

^g See equation 3 in the text.

^h Experimental data (see section 2.1.2).

Sources: ¹(Ayadi *et al.*, 2003; Caja *et al.*, 2004); ²(Rodgers *et al.*, 2005); ³(Park *et al.*, 2007); ⁴(Snipes and Lengemann, 1972); ⁵(Konar *et al.*, 1972); ⁶(Bobbo *et al.*, 2017); ⁷(Alberghina *et al.*, 2010); ⁸(Vestweber and Al-Ani, 1984); ⁹(Neville and Watters, 1983); ¹⁰(Balthazar *et al.*, 2017); ¹¹(Martens and Stumpff, 2019); ¹²(Oh and Deeth, 2017); ¹³(Rodgers and Rowland, 2006); ¹⁴(“Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions,” n.d.); ¹⁵(Ziv and Sulman, 1972); ¹⁶(Nouws *et al.*, 1985a); ¹⁷(Rule *et al.*, 2001); ¹⁸(Nouws *et al.*, 1985b); ¹⁹(Craigmill, 2003); ²⁰(Achenbach, 1998); ²¹(Prosser, 1996); ²²(Thompson, 1980)

2.4. Model calibration

Individual plasma concentrations measured in the current study (study A, see Table 2) were used to calibrate the rate of OTC absorption after IM administration (k_{IM}). The PBPK model with all parameters fixed (except k_{IM}) was used (see Table 1) and only k_{IM} and its standard deviation were estimated using the Stochastic Approximation Expectation-Maximization (SAEM) algorithm method, for each species. Data below the LLOQ (BLQ) were treated as left-censored observation using the so-called M4 method (Beal, 2001).

The residual errors (RV) of the PBPK model were set to the value of the intermediate precision of the analytical method (see section 2.1.4) in plasma and milk, for each species, assuming that the errors due to model misspecification or other unknown sources were negligible.

Table 2: Experimental Studies of OTC in Cows and Goats Used for Calibration and Validation of the PBPK Model

Modelling purpose	Study ID	Route	Dose (mg/kg)	Species (n)	BW (kg)	Matrix	IMI	V _{milk}	TB, TP
Calibration (estimation of k _{IM}) ¹	A	IM	10 (SD)	Cow (6), Goat (6)	568	P	8h, 16h	Yes ^a	Yes ^b
Internal evaluation ¹	A	IM	10 (SD)	Cow (6), Goat (6)	568	M	8h, 16h	Yes ^a	Yes ^b
External evaluation ²	B	IV	5 (SD)	Cow (19)	603	P, M	NA	NA	NA
External evaluation ³	C	IM	10 (5 doses, OD)	Cow (20)	577	M	12h	Yes ^a	NA
External evaluation ³	D	IV	10 (SD)	Cow (4)	643	M	12h	Yes ^a	NA
External evaluation ³	E	IV + IM	10 (SD) for IV + 10 (4 days, OD) for IM	Cow (4)	634	M	12h	Yes ^a	NA
External evaluation ⁴	F	IM	20 (SD)	Goat (5)	56	P, M	24h	NA	NA
External evaluation ⁴	G	IV	20 (SD)	Goat (5)	56	P, M	24h	NA	NA

^a At each milking; ^b Once per animal before OTC administration

Note: IM: intramuscular; k_{IM}: intramuscular absorption rate; IV: Intravenous; SD: single dose; OD: once daily; P: plasma; M: milk; NA: not available; IMI: inter-milking interval; V_{milk}: Volume of milk measured, TB: butyrous rate; TP: protein rate

Sources: ¹Current study; ²(Nouws et al., 1985a); ³Unpublished study; ⁴(Rule et al., 2001)

2.5. Establishment of the Population PBPK (popPBPK) Model

Monte Carlo Simulations were performed to generate a virtual population of cows and goats (n=1000 each) taking into account the inter-individual variability (IIV) and uncertainties of the

parameters from the PBPK model. A log-normal distribution was assumed for all parameters because of their asymmetric distribution and their strictly positive values (Fenneteau et al., 2009), and was assumed to represent the IIV (for physiological parameters) and uncertainty (for physico-chemical parameters). Coefficients of variation (CV) were found in the literature based on previous experimental data or set at 30% for physiological and 20% for drug-related parameters with no experimental values, (see **Table S3 for cow and S4 for goat in the section 2.4 of the supplementary materials**) (Clewell and Clewell, 2008; Henri et al., 2017a; Li et al., 2019a).

The code was written to ensure that the sum of the volume fractions or that of the blood flow fractions did not exceed 1, (“Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling - 1st Edition,” n.d.) (see **code in section 4. of the supplementary materials**).

2.6. Model Evaluation: Validation and Sensitivity Analysis

The evaluation of the popPBPK model was carried out by graphical goodness-of-fit (GOF) and statistical criteria, with an internal validation comparing the model predictions to the experimental data generated in our study (study A), and an external validation comparing the predictions to data from the literature and unpublished data (studies B to G, see Table 2). If predictions fell within a factor of 2 of the experimental data, the popPBPK model was considered as acceptable by the World Health Organization (WHO) (WHO et al., 2010). The mean absolute percentage error (MAPE) and the determination coefficient (R^2), based on linear regression of model observations versus simulations, were also calculated to assess GOF and model performance (Cheng et al., 2016). The popPBPK model was considered as valid if the MAPE value was lower than 50% and the R^2 was at least 0.75 (Li et al., 2018) (Li et al., 2019b). Visual Predictive Check (VPC) were generated by performing Monte Carlo simulations ($n=1000$ animals), considering both IIV and RV. The milk and plasma predictions interval (PI) (5th and 95th percentiles) were plotted against the experimental data.

The external validation was conducted using average concentrations (and standard deviation if available) from external and independent datasets for each species treated with a conventional OTC formulation with different dosing regimens (dose and route of administration) (studies B to G see Table 2). Plasma and milk data found in the literature were

extracted from selected studies using WebPlotDigitizer (version 4.4, year 2020, California USA, <https://automeris.io/WebPlotDigitizer>).

For study B, the IMI was not specified in the article and was set at 8 and 16 hours, as in the current study. When some parameters were not specified, such as volume of milk produced per milking (for studies B, F and G) and fat, casein and protein levels (for all external data sets), they were simulated.

In order to simulate milk volumes of the 1000 animals, we fitted a linear mixed effects model (SAEM algorithm with Monolix software) to our experimental measured milk volumes (study A, see Table 2) (cows and goats separately). This model included an intercept, an effect of milking interval and inter and intra animal variability. From this model we could simulate different volumes of milk for each animal ($n=1000$) at each milking.

To simulate the milk fat, casein and whey proteins levels and the body weights of the 1000 animals, we used data (mean and dispersion value) from the literature ((Balthazar et al., 2017; Leitner et al., 2004) for milk composition; (Nouws et al., 1985a; Rule et al., 2001) and unpublished study for body weight) to draw different values for each simulated animal ($n=1000$) of each species. The nominal doses administered (in mg) were adjusted to match the simulated weights for each animal of each species.

The ability of the model to predict concentrations of OTC in milk of cows and goats with other doses and routes of administration was assessed by comparing the external dataset with the 90% PI from the VPC.

A global sensitivity analysis (GSA), using the so-called *extended-FAST* method (Saltelli and Bolado, 1998), was performed to assess the influence of 66 input parameters on milk model predictions (see parameters with an asterisk in Table 1 and **Table S2 in supplementary materials**). A uniform law was considered and each parameter was changed by $\pm 10\%$ of the median value, simultaneously (Peters, 2012). With the GSA, input parameter influence could be divided into main effects and total effects where the difference between main and total effects (additional effects) represented parameter interactions. Because total effects are the most robust indicators of PBPK parameter influences (Jarrett et al., 2016), they are the only ones discussed here. The outputs considered were area under the curve of OTC total concentration in milk between time 0 and 96 (AUC_{96h}) and OTC total concentration in milk at 96h (C_{96h}). Total effects

above the typical threshold value of 0.1 indicated significantly sensitive parameters (Jarrett et al., 2016; Li et al., 2017; Peters, 2012).

Moreover, variations of a factor 10 of the nominal value of the Papp, which can vary far more than 10% between drugs, have been explored (see section 3.3).

2.7. Model Application

An estimation of the withdrawal period (WP) in milk was performed using the popPBPK model, based on results of the Monte Carlo simulations (n=1000) with the IIV but without the RV, with the standard dosing regimen specified in the SPC of the Terramycin® speciality (*i.e.*, 10 mg/kg/day for 4 days or 5 mg/kg/day for 3 days by IM route). The time (rounded up to the next whole day) for which the 99th percentile is equal to the MRL (100 µg/kg for milk) since the last injection was defined as the (predicted) WP in milk. Volume of milk and rate of milk fat, casein and whey proteins of each animal were drawn as explained above (see section 2.6). Body weight were simulated based on mean and dispersion value from the litterature (Lautz et al., 2020).

2.8. Software

Monolix (version 2020R1. Antony, France: Lixoft SAS, 2020) was used to develop the popPBPK model and Simulx (version 2020R1. Antony, France: Lixoft SAS, 2020) to run all the simulations. The model code is available in **Supplementary Materials**. Graphs were done using GraphPad Prism (version 9.1.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). GSA was done with Rstudio (v 1.4.1106, RStudio Team, 2009-2021, PBC, Boston, MA, <http://www.rstudio.com/>) and the sensitivity package (v 1.26.0; Iooss 2021; <https://CRAN.R-project.org/package=sensitivity>).

3. Results

3.1. Model Calibration

The observed plasma data BLQ (18%) were used to estimate only the IM absorption rates (k_{IM}) for each species with a very good confidence ($RSE < 15\%$), given a typical value of 0.17 h^{-1} and 0.45 h^{-1} for cows and goats, respectively (**see section 3.1.1 of the supplementary materials**). The associated IIV values (used for the popPBPK model application, see below) were equal to 22% for cow and 30% for goat, with rather good precision ($RSE < 30\%$).

3.2. Simulations from the popPBPK Model

One thousand (1000) virtual individuals of each species with specific body weight, volume and composition of milk produced were simulated. The distribution and range of all parameters of these virtual populations are presented in **section 2.4. of the supplementary materials**.

3.3. Model Evaluation: Validation and Sensitivity Analysis

For internal validation using the observed concentrations from the current study (study A, see Table 2), the VPC showed that most of the observed data (95%) in both plasma and milk were within the 90% PI for both species (Figure 2 for cow and Figure 3 for goat). The BLQ data were also well predicted.

In cow's milk (Figure 2B and D), 73% of typical predictions were within a factor of 2 of the experimental data. The R^2 and the MAPE were 0.92 and 29%, respectively, which met the validation criteria in milk of cows (Figure 2F).

Similarly to the cow model, 67% of the typical predictions in milk of goats were within 2-fold of the experimental data (Figure 3B and D). The R^2 and MAPE of 0.99 and 12%, met the validation criteria in goat milk (Figure 3F). The internal validation of our popPBPK model, based on our experimental data, was therefore considered successful.

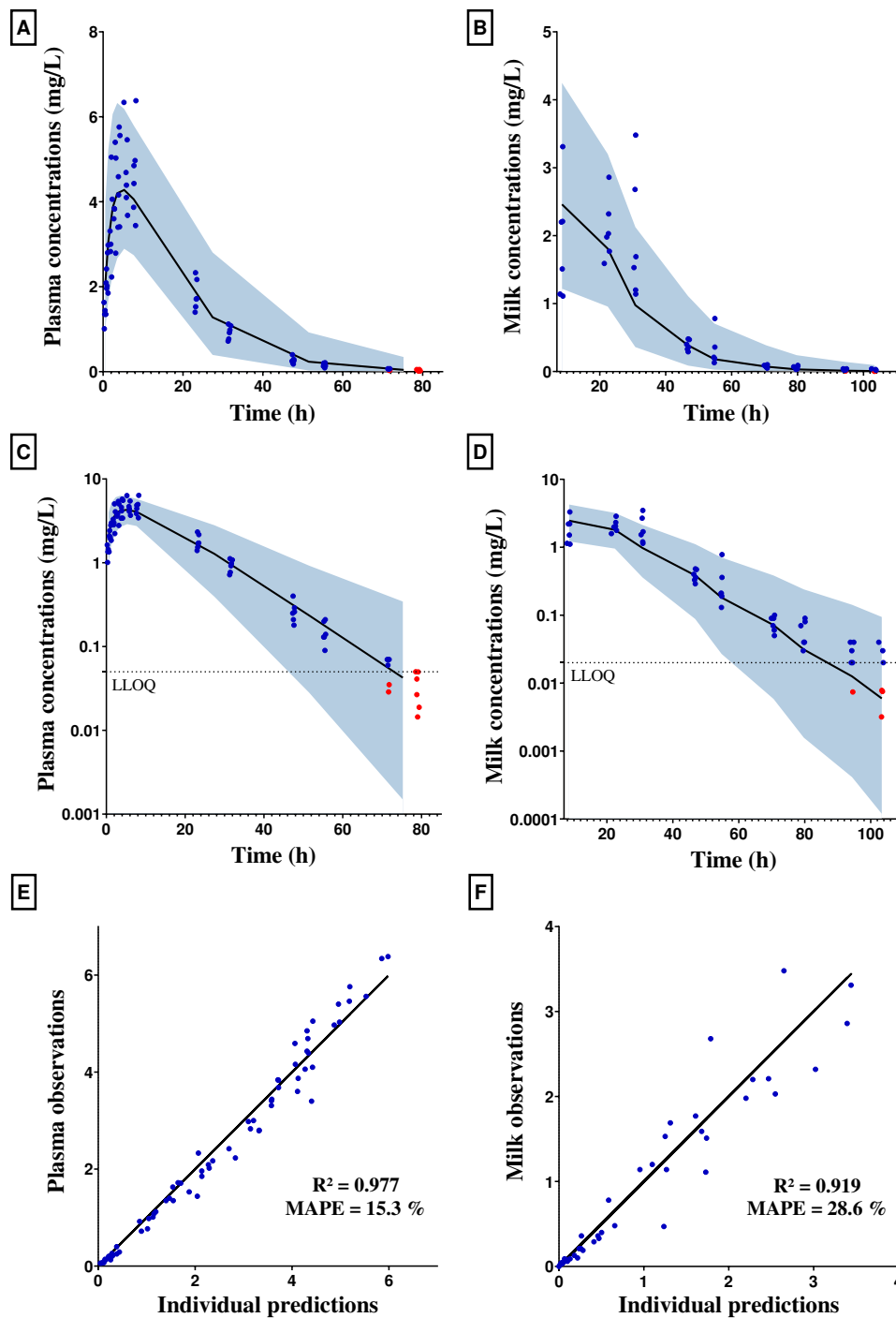


Figure 2: Visual predictive check of OTC concentrations in cow plasma (A,C) and milk (B,D) using the popPBPK model. The median is represented by a solid black line and the 90% prediction interval is represented by the blue area. The experimental data (individual data points) from the current study are represented by circles. The dotted line represents the lower limit of quantification (LLOQ, 0.05 µg/ml for plasma, 0.02 µg/ml for milk). Data below the LLOQ are marked in red and estimated by the model. The lowest panel represents the result of a regression analysis between model predictions and measured OTC concentrations in plasma (E) and in milk (F). The coefficient of determination (R^2) and mean absolute percentage error (MAPE) are shown in the panel.

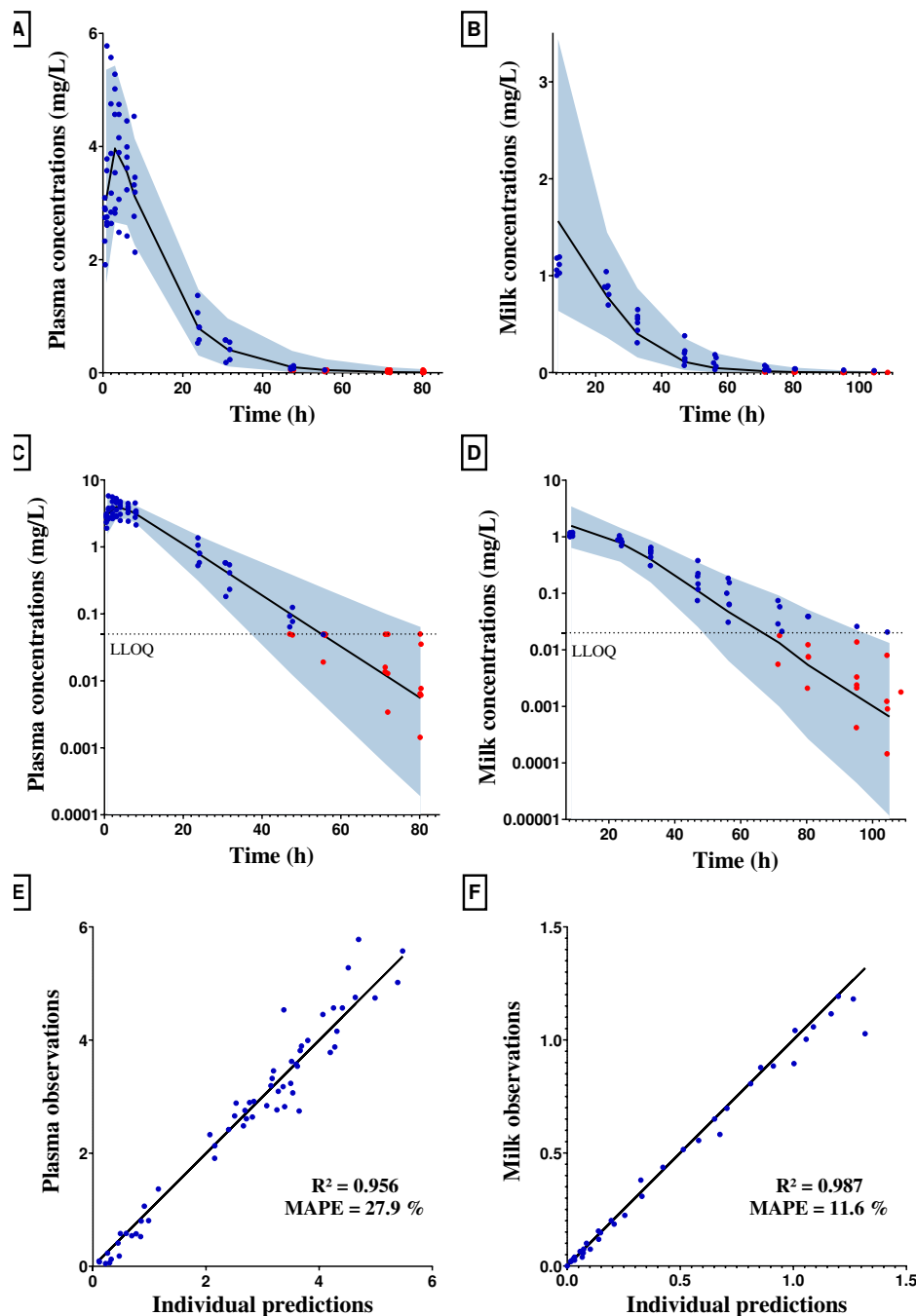


Figure 3: Visual predictive check of OTC concentrations in goat plasma (A,C) and milk (B,D) using the popPBPK model. The median is represented by a solid black line and the 90% prediction interval is represented by the blue area. The experimental data from the current study are represented by circles. The dotted line represents the lower limit of quantification (LLOQ, 0.05 µg/ml for plasma, 0.02 µg/ml for milk). Data below the LLOQ are marked in red and estimated by the model. The lowest panel represents the result of a regression analysis between model predictions and measured OTC concentrations in plasma (E) and in milk (F). The coefficient of determination (R^2) and mean absolute percentage error (MAPE) are shown in the panel.

For the external validation in cow, (see **Figures S3 and S4 of the supplementary materials**), after IV of 5 mg/kg (study B, see Table 2), the model underestimated the initial plasma concentration (the typical predictions for the first 0.6 hours were 33-47% of the observed mean values) but concentrations measured at late time points were well predicted (within a factor of 2 after one-hour post administration). In milk, 86% of the predictions were within a factor of 2 of the observed data. After five IM administrations of 10 mg/kg/day (study C), the model well predicted (within a factor of 2) milk concentrations up to 168h and underestimated the last time points (predictions of the last time points were lower than 37% of the observed data). Overall, 78% of the milk predictions were within a factor of 2 of the observed data. After IV administration of 10 mg/kg (study D), the model well predicted milk concentrations up to 96 hours post-administration but under-estimated the last time points. The LLOQ of the unpublished data was 0.01 µg/mL, and 3, 4, 2 and 4 animals were BLQ at 108h, 120h, 132h, and 144h after administration, respectively. After one IV and four IM injections of 10 mg/kg (study E), 72% of the predictions were within a factor of 2 of the observed data.

For the external validation in goat, (see **Figure S5 A-B in the section 3.2 of the supplementary materials**), after IM administration of 20 mg/kg (study F), the model slightly underestimated the last time points in plasma (but still within a factor of 2). In milk, 60% of model predictions were within a factor of 2 of the observed data. After IV administration of 20 mg/kg (see **Figure S5 C-D in the section 3.2 of the supplementary materials**) (study G), the model overpredicted the late plasma concentrations. In milk 88% of predictions were within a factor of 2 of the observed data.

Overall, based on external data on OTC concentrations in cow or goat milk from the literature or unpublished dataset, we considered our popPBPK model as valid.

A GSA was carried out for sixty-six parameters of the PBPK model, (identified by an asterisk in Table 1 and **Table S2 in supplementary materials**). The results are presented in Figure 4 for AUC_{96h} and C_{96h} in milk of cow and goat. Three parameters having a sensitivity coefficient (total effect) higher than 0.1 were considered to have a significant impact on AUC_{96h} for both species. Seven parameters for cow and height parameters for goat were considered to have a significant impact on C_{96h}.

The predicted AUC_{96h} in milk was sensitive to the acid pK_a of OTC (0.42 for cow, 0.48 for goat), the pH of EW (0.39 for cow, 0.42 for goat) and the pH of milk (total effect of 0.15 for both species). The predicted C_{96h} in milk was also sensitive to these three parameters but also to the pH of IW (0.77 for cow, 0.80 for goat), the total plasma clearance (CL_{plasma} , coefficient of 0.23 for cow, 0.34 for goat), the partition coefficient in muscle (k_{muscle} , coefficient of 0.21 for cow, 0.56 for goat), and in kidneys (k_{kidney} , coefficient 0.10 for cow and of 0.54 for goat), and to the F_{IM} (0.13) for goat.

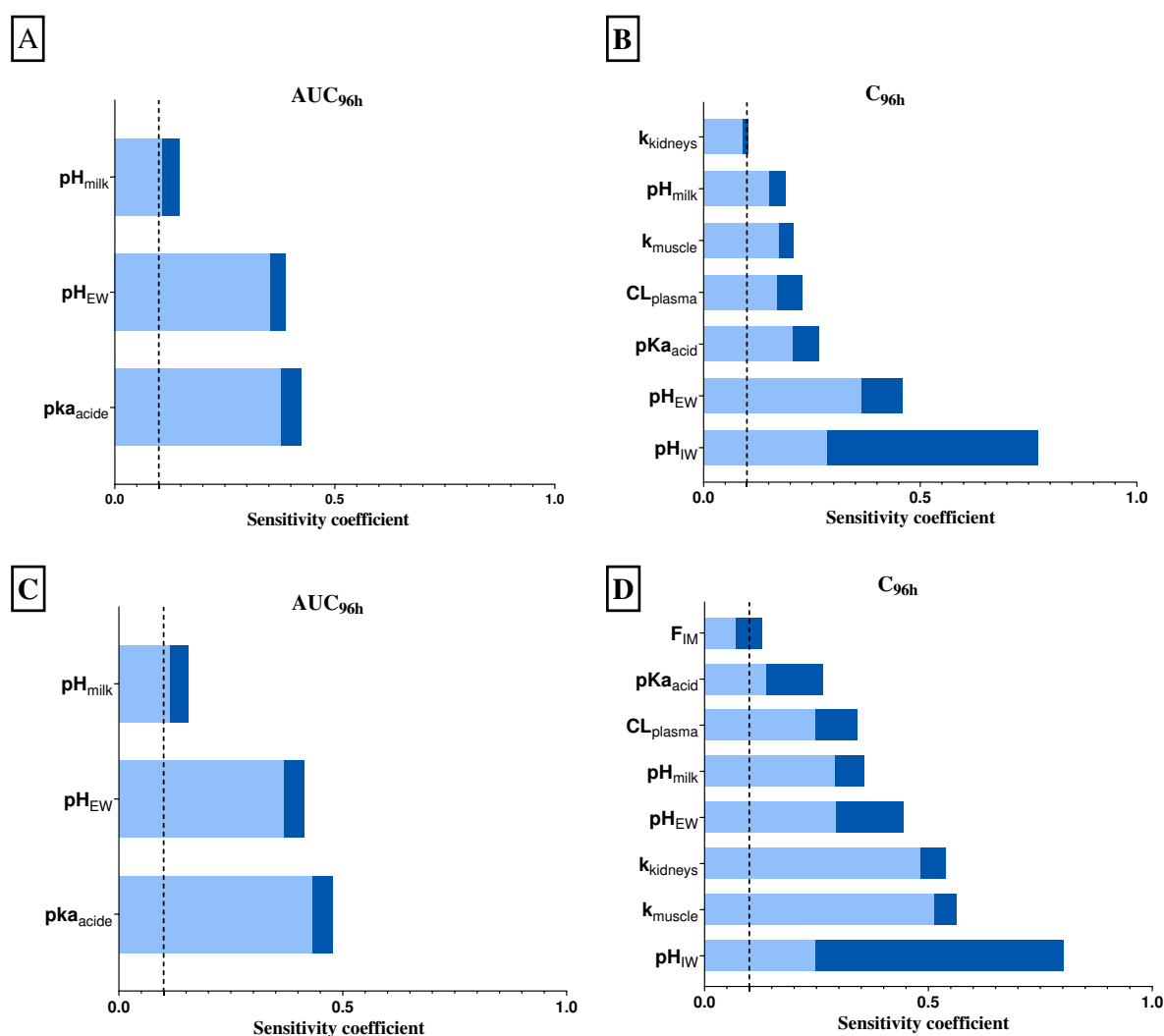


Figure 4: Global sensitivity analysis of the PBPK model of OTC in cow milk (upper panel) and in goat milk (lower panel). The sensitivity coefficient was estimated after a + 10% variation of the 66 inputs parameters on OTC area under the curve (AUC) between 0 and 96h (A, C) and concentration at 96h in milk (B, D). Main effects are presented in light blue and total effects in dark blue. The dotted line represents the threshold of 0.1 for determining the impact of a parameter.

To illustrate the influence of the milk pH, a change of 10% of its initial value in cow (6.68), resulted in a variation of the AUC of its initial value (68 mg/L.h) ranging from -18% (56 mg/L.h) when the pH is lower (6.01) to +84% (125 mg/L.h) when the pH is higher (7.35) (see Figure 5A).

To illustrate the influence of the OTC acid pKa, a 10% change in its initial value (7.25), resulted in a variation of the AUC of its initial value (68 mg/L.h) ranging from -60% (28 mg/L.h) when the acid pKa is lower (6.53) to +67% (113 mg/L.h) when the pH is higher (7.98) (see Figure 5B).

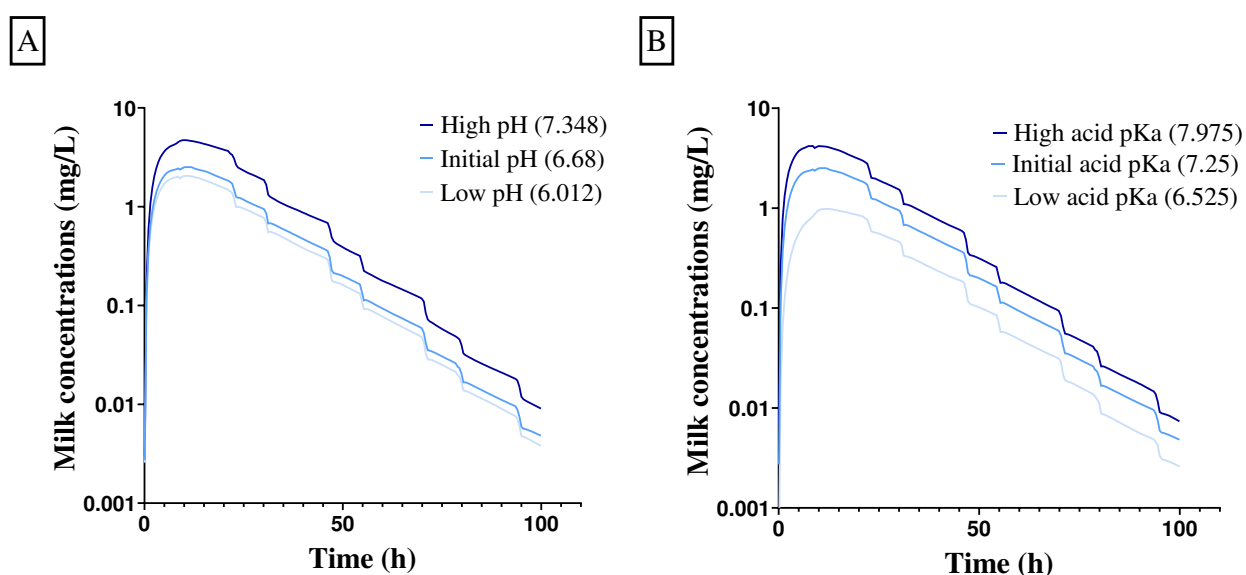


Figure 5: PBPK model predictions of OTC in cow milk with a variation of $\pm 10\%$ of milk pH (A), acid pKa of OTC (B).

We also evaluated the impact of permeability (P_{app}) on OTC excretion into milk with hypothetical lower or higher permeability. The concentration profiles in cow's milk are presented for 4 different P_{app} values in Figure 6. Thus, when P_{app} increases from 1.4×10^{-8} cm/s (very low permeability molecules) to 1.4×10^{-5} cm/s (high permeability molecules), the model predicts that AUC_{96h} increases by 626% (from 17 h.mg/L to 103 h.mg/L) while the time at which the concentration is maximal (T_{max}) in milk decreases from 19 h to 6 h and the maximum concentration (C_{max}) increases from 0.4 mg/L to 4 mg/L. However, between P_{app} of

10^{-5} (AUC_{96h} of 103 h.mg/L) and 10^{-6} cm/s (AUC of 99 h.mg/L), the impact on AUC was negligible.

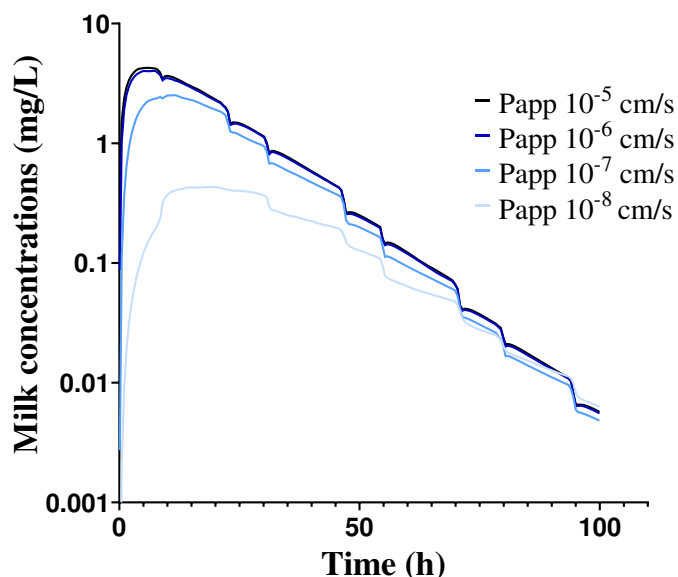


Figure 6: PBPK model predictions of OTC in cow milk with a variation of Papp from 10^{-8} to 10^{-5} cm/s.

3.4. Drug distribution in udder and milk

The total and free OTC concentrations over time within the plasma, udder sub-compartments and the milk as predicted by the popPBPK model are presented in Figure 7 A, C for cow and Figure 8 A, C for goat. Free concentrations were higher in plasma and EW (which were superimposed) than in IW and milk. In comparison, total concentrations were higher in IW but still lower than those in plasma and EW. The elimination slopes were parallel in all sub-compartments. In total concentrations, the T_{max} in plasma and EW were equivalent (5h for cow, 3h for goat), whereas that of IW (7.5h for cow, 6h for goat for IW) and milk (11h for cow, 8h for goat) were delayed.

Proportions of free or bound OTC to each component are detailed on Figure 7B for cow and Figure 8B for goat. In plasma and EW, the model predicts that OTC is mainly in unbound form (about 81% and 90% respectively) and weakly bound to albumin. In IW, the model predicts that OTC is more strongly bound (unbound fraction is about 47%) and that binding is mainly

to magnesium (Mg^{2+}). In milk the model predicts that OTC is bound to about 60%, mainly to Ca^{2+} (about 40%) and Mg^{2+} (about 15%).

Proportions of ionized or unionized OTC in each sub-compartment are presented on Figure 7D for cow and Figure 8D for goat. The fraction of ionized OTC was predicted to be 60% in plasma and EW (pH=7.4), 39% in IW (pH=7.0) and 29% in milk (pH=6.68 for cow, 6.65 for goat), highlighting again the strong influence of pH on OTC distribution.

Based on the results of the popPBPK model, the ratio of M/P (Eq 21, calculated between 0h and 96h), was 0.7 for cow and 0.5 for goat. The CL_{milk} was estimated as 0.44 L/h ($7.76 \cdot 10^{-4}$ L/h/kg) and 0.051 L/h ($7.67 \cdot 10^{-4}$ L/h/kg) for cow and goat, respectively.

Overall, 0.75% of the dose was excreted in the milk for cow, whereas it was 0.50 % for goat.

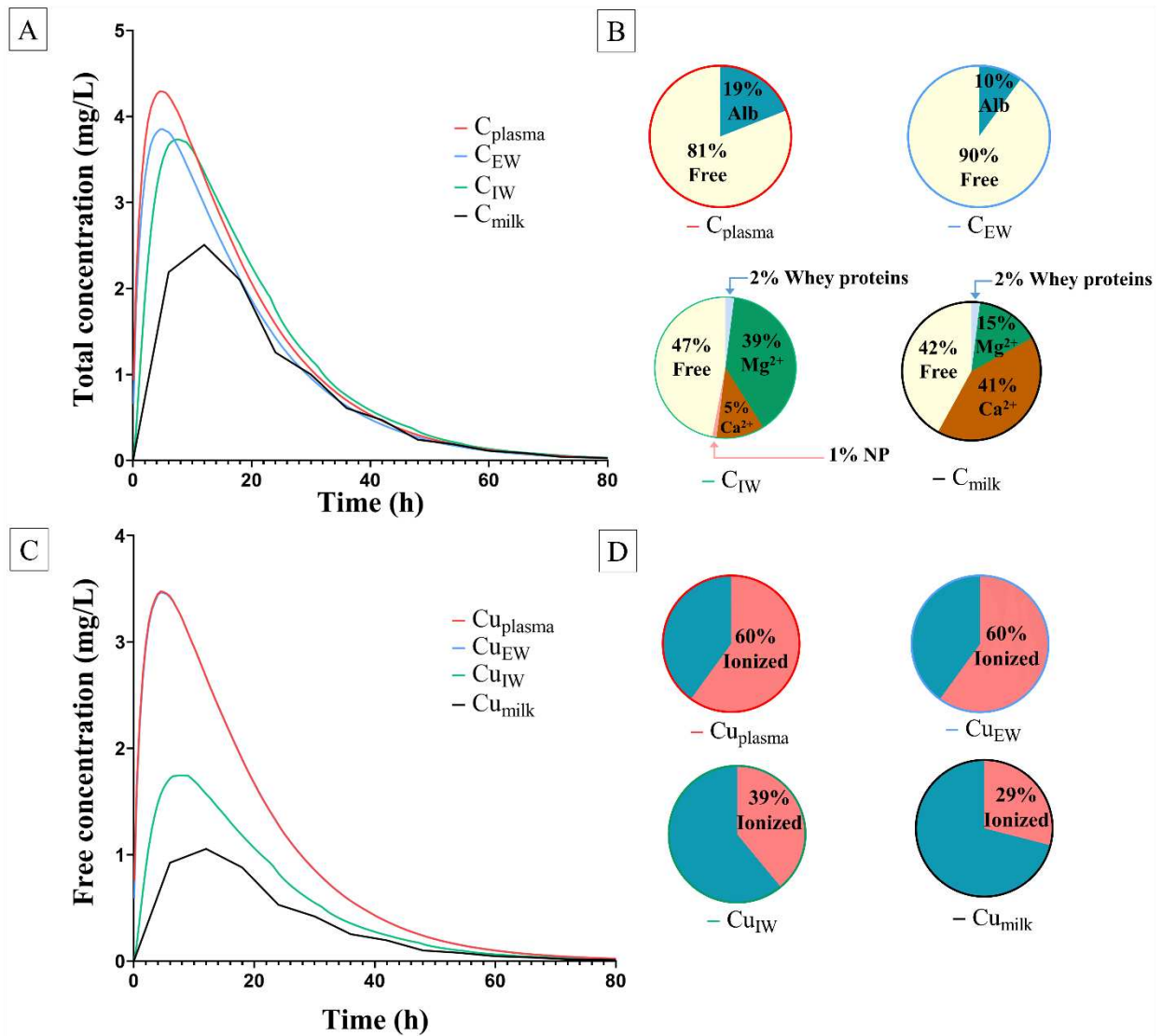


Figure 7: Predicted (A) total and (C) free concentrations of OTC in cow plasma (C_{plasma}) shown by the red line, extracellular water of udder (C_{EW}) shown by the blue line, intracellular water of udder (C_{IW}) shown by the green line, milk in alveoli, ductules and cistern (C_{milk}) shown by the dark line, after a single dose of 10 mg/kg by IM. In the upper right panel, pie charts represent the percentage of free drug and the percentage of drug bound to each component of the sub-compartments, as albumin (alb), ionized magnesium (Mg^{2+}), ionized calcium (Ca^{2+}) and whey proteins. In the lower right panel, pie charts represent percentage of ionized (shown in pink) and unionized (shown in turquoise) forms of the OTC in each sub-compartment.

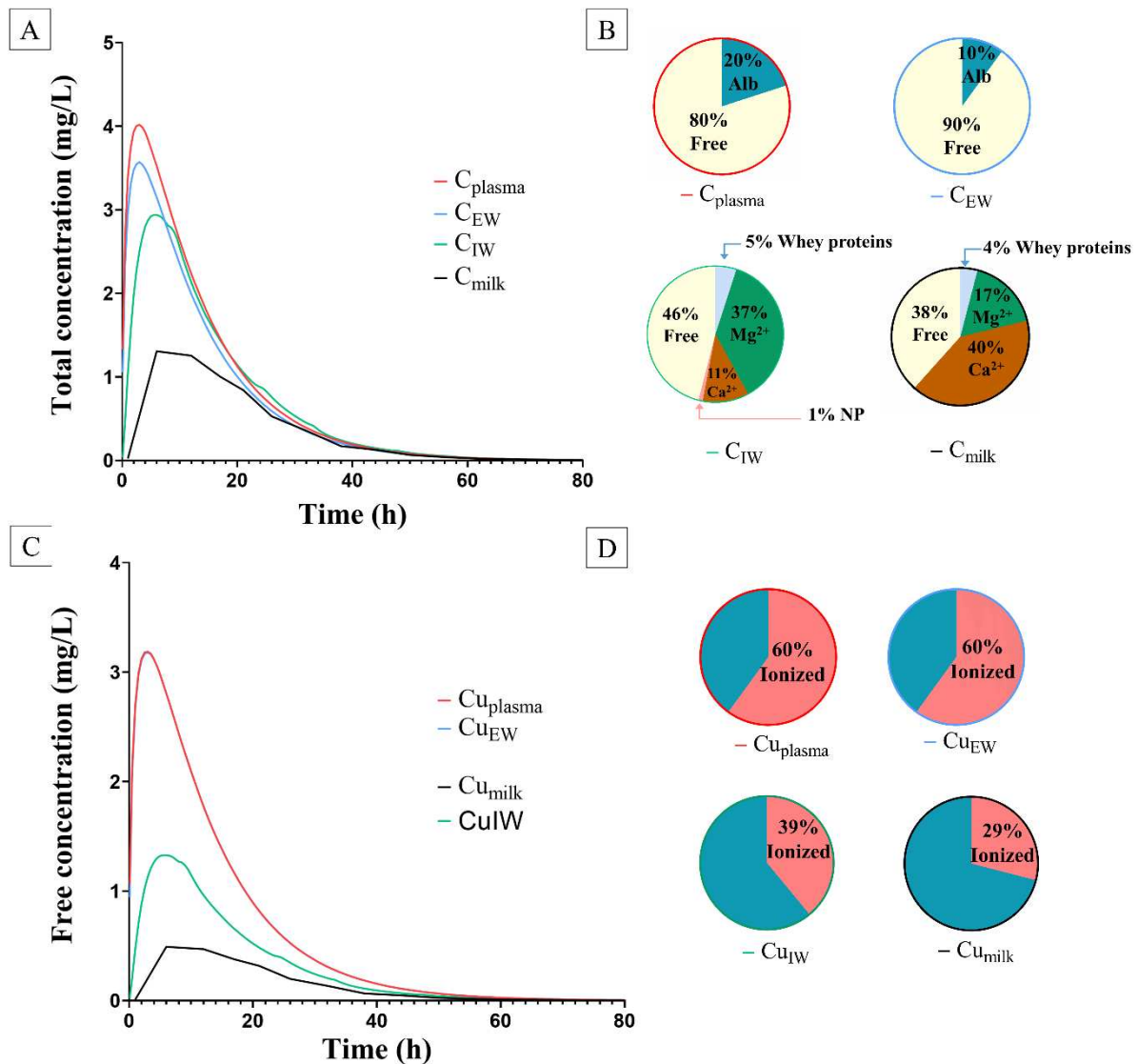


Figure 8: Predicted (A) total and (C) free concentrations of OTC in goat plasma (C_{plasma}) shown by the red line, extracellular water of udder (C_{EW}) shown by the blue line, intracellular water of udder (C_{IW}) shown by the green line, milk in alveoli, ductules and cistern (C_{milk}) shown by the dark line, after a single dose of 10 mg/kg by IM. In the upper right panel, pie charts represent the percentage of free drug and the percentage of drug bound to each component of the sub-compartments, as albumin (alb), ionized magnesium (Mg^{2+}), ionized calcium (Ca^{2+}) and whey proteins. In the lower right panel, pie charts represent percentage of ionized (shown in pink) and unionized (shown in turquoise) forms of the OTC in each sub-compartment.

3.5. Model Application

In milk, the WP after IM injections of 10 mg/kg/day for 4 days and 5 mg/kg/day for 3 days were predicted to be 5 and 4 days respectively for cow, whereas it was predicted to be 4 and 3 days for goat milk (Figure 9).

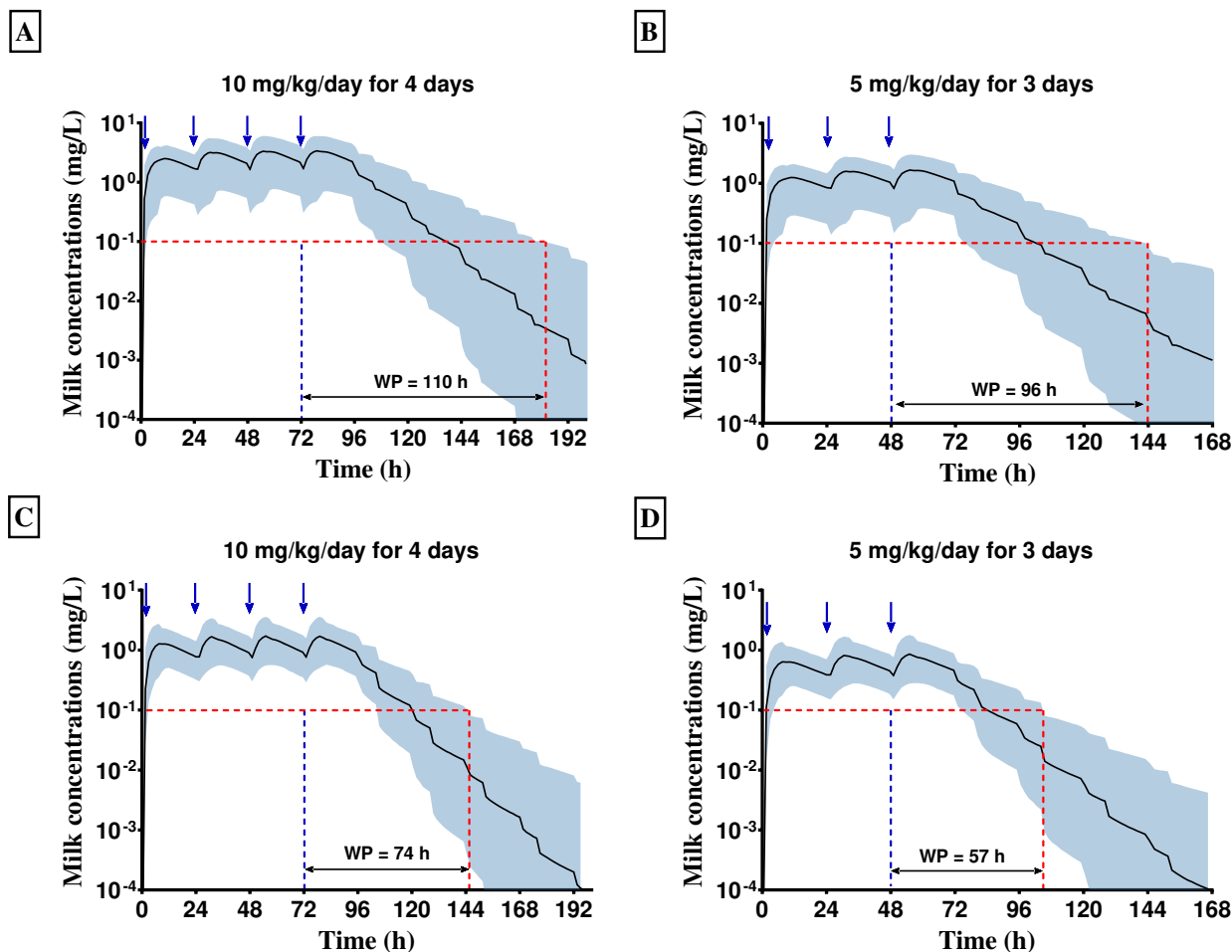


Figure 9: Simulation of OTC administration in 10 mg/kg/day for 4 days (A,C) and 5 mg/kg/day for 3 days (B,D) by IM route in cow (A,B) and goat milk (C,D). The maximum residue limit (MRL) is represented by a red dotted horizontal line and the time when the 99th percentile is equal to the MRL by a red dotted vertical line. WP is calculated by the difference between this time and the time of the last injection (72 hours or 48 hours)

4. Discussion

4.1. PBPK model objectives

We have developed a generic popPBPK model, detailed in terms of udder physiology and milk composition, so that it can be extrapolated to various compounds and species. To illustrate its usefulness, the model was used to predict the kinetic of OTC in cow and goat milk.

This model predicted the OTC concentrations we measured in plasma and milk from cows and goats, well. In this study, the M/P ratio for the cow was 0.7, which is slightly lower than the previously published value (1.2 to 2) but consistent with the observed value (0.7 calculated with a non-compartmental analysis from the observed data) (Nouws et al., 1985a). For the goat, it was 0.5 (there was no value found in the literature for comparison). The predicted percentage of the dose excreted in milk (0.8% for cow and 0.5 % for goat) was equal to that observed with the experimental data.

The model predictions compared to external data obtained in cows with different dosing regimens were also satisfactory. However, the predicted milk concentrations more than 96 h after the last administration sometimes underestimated the average concentrations measured (for unpublished studies C, D, E). As these concentrations were well below the limit of quantification, this potential bias is perhaps analytical. On the other hand, since we do not have the measured plasma concentrations with these external data sets, we cannot know whether this bias is due to poor plasma predictions or only to poor milk predictions.

In goat the model correctly predicted external concentrations of OTC in milk after IV and IM of 20 mg/kg (Rule et al., 2001), with a slight overestimation of late concentrations after IV administration, because of poor predictions of plasma concentrations.

4.2. Comparison to other PBPK model

4.2.1. PBPK model of OTC in non-lactating species

A few PBPK models are available for OTC in non-lactating species. The model of OTC in sheep (Craigmill, 2003) and the one in cattle (Achenbach, 1998) allowed us to obtain the tissue partition coefficients for the current PBPK model. The model of Lin *et al* of OTC in dog (Lin et al., 2015) considered some tissues as permeability limited (*i.e.*, fat, muscle, slowly perfused

tissues) whereas the models of Craigmill and of Riad (Riad et al., 2021), considered all tissues as perfusion limited. For the current model, a perfusion-limited model structure was also chosen for tissue distribution, except in the udder, because it adequately predicted the OTC plasma concentrations while avoiding the addition of uncertainties of limited permeability parameters.

Some existing models used a two-compartments model (with two different rates) to describe the IM absorption of a long-acting formulation of OTC (Achenbach, 1998; Lin et al., 2015; Riad et al., 2021). In the current model, a simple first order absorption was sufficient to correctly predict the plasma kinetic of the conventional formulation of OTC. As the IM absorption rate (k_{IM}) was not available for the target formulation and species, we chose to estimate it with the current plasma data. This was the only parameter that was estimated in the model, with good confidence.

4.2.2. PBPK model of the udder

This new model is the first PBPK model to use a permeability-limited sub-model for the udder, distinguishing the VASC, EW, and IW spaces of the udder. Compared to perfusion-limited models, it allows to describe the mechanisms by which slowly equilibrated drugs are distributed into the udder and reach the milk.

The udder IW acted as a deep compartment (see discussion below) in a more physiological manner than the empirical retention compartment mimicking the hypothetical drug adsorption on the alveolar epithelium described by Woodward *et al* (Woodward and Whitem, 2019). Moreover, the low permeability (Papp) of OTC impacted the rate of release into milk.

In the current model, exchanges between milk (alveolar space) and the IW of the udder were considered, mimicking reabsorption into the systemic circulation (Ziv and Sulman, 1975), as discussed by Li *et al* (Li et al., 2018).

Similarly to the model by Woodward *et al* (Woodward and Whitem, 2019), the current model considered milk production in the alveoli, transport via the ductules, storage in the cistern, and residual volume remaining in the ductules after milking. Our model, however, did not take into account a delay before filling the cistern, but considered a passage of milk from the alveolar space to the cistern at a rate equal to the average rate of increase of the milk volume in the cistern during the milking intervals.

In order to be able to predict milk concentrations over time, and not only at the time of milking, we assumed a linear increase in the volume of milk produced during the milking intervals. The Hill equation, described in several papers (Whitem, 2012), mimicking the nonlinear increase in milk volume was not used because it would have required the estimation of parameters from the volumes of milk we measured and we preferred to use these experimental values directly. Furthermore, our experimental data showed that milking volume was almost proportional to IMI, which justified the linear increase in volume.

4.3. Factors influencing passage into the milk

In this model we have tried to take into account many physiological and physico-chemical factors, such as binding to milk components or passive diffusion, that can influence the passage into milk. In the case of the passage of OTC into cow and goat milk, the global sensitivity analysis (GSA) showed that the most influential factors were the ionization (pH and pKa) on AUC_{96h} and the systemic exposure (CL_{plasma} and k_{tissue}) on C_{96h} . The rest of the 66 parameters tested in the sensitivity analysis (see parameters with an asterisk in Table 1 and **Table S2 in supplementary materials**) had less impact on the predictions of AUC_{96h} and C_{96h} of OTC in milk.

In addition to the factors identified by the GSA, we also discussed the influence of two other factors: binding in the whole udder ($ka_{Ca^{2+}}$, $ka_{Mg^{2+}}$...) (see section 4.3.3) and OTC permeability (P_{app}) (see 4.3.4) on the passage of OTC in milk.

4.3.1. Systemic circulation

In the current model, the exchange between plasma, IW and milk acts by passive diffusion of the unbound and unionized form of OTC. We therefore have the same AUC_{96h} of the unbound and unionized form of OTC in these 3 compartments highlighting the strong impact of plasma PK on the passage into milk. It is therefore important in such a PBPK model to have a reliable model for the systemic PK to adequately describe the passage of a compound over the blood-milk barrier. That's why we choose to estimate the k_{IM} from our experimental animal study.

We have chosen to make a whole PBPK model, including systemic PK, because of the available PK models in cow and goat (*i.e.*, known CL_{plasma} , $fe_{kidneys}$, F_{IM} and f_{up}) and the

available PBPK models, allowing us to obtain the partition coefficients for each tissue. In addition, having a complete PBPK model, which is more generalizable, will allow easier future cross-species and cross-molecule extrapolations. Alternatively, we could have developed a classical compartmental model of the plasma data, in order to have a reliable plasma PK model, and established a minimal PBPK model including only the udder part as Woodward *et al* (Woodward and Whittem, 2019). This could be interesting for species where physiological data are lacking.

Plasma clearance had a significant impact on the C_{96h} of OTC in milk. The impact of CL_{plasma} on the terminal elimination slope in plasma and milk explains its influence on the predicted residual concentrations in milk. In our model CL_{plasma} was obtained from the literature and split between renal and hepatic clearances based on published data of unchanged excreted fraction in urine (Nouws et al., 1985b). This elimination model is not the most mechanistic one and for future cross-species extrapolations, it will have to be adapted with more physiological data of hepatic or renal elimination (e.g. glomerular filtration and tubular secretion), using also more mechanistic PBPK model for such pathway (Mevius et al., 1986; Viel, 2018).

Among the partition coefficients, the k_{muscle} and the $k_{kidneys}$ significantly affected C_{96h} in the GSA (see Figure 4). As these parameters were used in the calculation of the lumping compartment partition coefficient (k_{rest} , see Equation 3), and since the lumping compartment was the largest compartment in terms of volume (about 40% of the total weight), it is not surprising that these partition coefficients were the most influential on systemic PK, especially on the terminal slope, and therefore milk exposure. As observed in GSA, the impact of $k_{kidneys}$ is greater for goat than for cow probably due to the fact that the volume of the richly perfused tissue is greater in the goat (8% of BW versus 4% for cow).

Several methods can be used to predict the k_{tissue} if *in vivo* data are missing from the literature. For comparison, cow k_{tissue} were calculated using the equations of Rodgers and Rowland (RR) (Rodgers et al., 2005) (see **Table S6 in section 3.3 of the supplementary materials**). Only the k_{tissue} of fat calculated by RR is equivalent to that found in the literature, while the others were lower (by 15% for kidneys to 52% for liver). The much lower systemic distribution predicted using RR k_{tissue} led to much lower plasma and milk elimination half-lives (4.5h vs 9.1h in milk and 4.2h vs 7.9h in plasma) (see **Figure S6 in the section 3.3 of the supplementary materials**). The k_{tissue} obtained from literature allowed a better description of our experimental data, even if the predictions of RR were quite good, confirming that when

possible, experimental data should be preferred to predictions from theoretical equations (Yau et al., 2020).

4.3.2. Ionization

The current PBPK model accounts for the ionization of OTC in each udder and milk sub-compartments. As observed in GSA, the acid pKa of OTC as well as the pH of the udder and milk sub-compartments had a significant impact on the AUC_{96h} and C_{96h} of OTC (see Figure 4).

Only the unionized form can passively diffuse across physiological membranes, but equilibria are re-established once the membranes are passed depending on the pH of the medium. As the acid pKa of OTC (7.25) is close to the plasma (7.4), IW (7.0) and milk (6.7) pH values, small variations in pKa or pH led to large variations in ionized fractions. Thus, due to the lower pH in milk than in plasma, the ionized fraction was lower in milk (29% instead of 60%). Since the non-ionized concentration of OTC is the same in the different compartments (notably plasma and milk), and the ionized concentration is lower in milk than in plasma, the whole free concentration in milk is predicted to be lower than that in plasma (see Figure 7 and Figure 8).

The pKa values of OTC were based on an empirical calculation (Szegezdi and Csizmadia, 2007, 2004) and were comparable to values reported in the literature (Carlotti et al., 2012; Stephens et al., 1956; Tongaree et al., 1999). However, as evidenced by these publications, for zwitterions (with multiple chemical groups), it is difficult to determine with certainty to which groups these pKa are assigned. This difficulty is probably related to the determination method and conditions (temperature, solvent) used (Reijenga et al., 2013).

Regarding cells and tissues, due to missing values in the literature for ruminants, pH values were taken from other species (Rodgers et al., 2005; Waddell and Bates, 1969). They have been shown to be equivalent for animal cells and tissues from different species (for healthy and un-anesthetized animals). Regarding the milk, the pH is also similar between species. However, it can change over time, e.g. colostrum has a lower pH (6.3) than milk at the end of lactation (McIntyre et al., 1952), and according to certain physio-pathological conditions, e.g. when the animal suffers from mastitis the pH is higher (7.4) (Ziv et al., 1974). Hence, to refine

the PBPK model it would be useful to include the physiological variation of milk pH over the different lactation and (patho)physiological stages.

4.3.3. Binding

Our PBPK model has the advantage of accounting for the distribution of OTC in milk fat and aqueous phase, its binding to casein, whey protein, ionized magnesium, and calcium. Because the composition of milk varies between species (Balthazar et al., 2017; Park et al., 2007) and that affinities differ between molecules, it is important to account for all major milk components for future cross-species and cross-molecule extrapolations. We considered the binding of OTC to ionized cations as this is a known characteristic of tetracyclines (as for fluoroquinolones) (Ross and Riley, 1993) and since Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations are high in milk. We have neglected somatic cell binding, because even in case of serious mastitis (5 000 000 cells/ml), the volume of somatic cells represents less than 0.2% of the milk volume (Campbell and Marshall, 2016). Furthermore, to our knowledge, no article mentions the binding of OTC to white blood cells.

The affinities of OTC for the milk components (*i.e.*, fat, casein, calcium and magnesium) were calculated using linear regressions, constructed from experimental data available in the literature for several drugs (Carlotti et al., 2012; Lupton et al., 2018; Shappell et al., 2017). However, in case of extrapolation to other molecules, these data may not be available. Recently, Abduljalil *et al* (Abduljalil et al., 2021) proposed an approach to calculate the free fraction in milk (f_{milk}) from the lipophilicity ($\log P$) of a molecule. However, this approach would appear to have some limitations, as for OTC, which has a low $\log P$ (-4.54), the f_{milk} value estimated using the formula of Abduljalil *et al* is higher than 1 (1.26 for both species).

According to our model, OTC was predicted to be bound more in milk (about 60%) than in plasma (about 20%). OTC was predicted to be bound mainly to ionized calcium, ionized magnesium and lightly to whey proteins, so it was mainly within the skim milk. These findings could be interesting concerning the milk by-products.

Our PBPK model also takes into account the binding of OTC to different cellular components in the udder (*i.e.*, lipids and phospholipids). The partition coefficient of OTC between udder and plasma (k_{udder} , ratio of udder and plasma concentrations) was calculated to be 0.75 for cow and 0.77 for goat. It is of the same order of magnitude as those of other tissues

(i.e., muscle, liver, rest) (see Table 1). As mentioned above, the binding in the udder IW resulted in drug retention and IW acted as a deep compartment. The slow release of the drug from the IW sub-compartment partly explains the delay of $T_{\max}$ in milk compared to plasma. This compartment could thus be useful for extrapolation to other molecules, especially those with strong IW binding.

4.3.4. Passive diffusion

The current PBPK model accounts for passive diffusion (CL_{diff}) between the udder and milk, calculated from *in vitro* permeability (Papp). Papp is a parameter that varies greatly between molecules (e.g. caffeine with a Papp of 10^{-5} cm/s; norfloxacin with a Papp of 10^{-7} cm/s (Chen et al., 2008) and amoxicillin with a Papp of 10^{-8} cm/s in an internal unpublished study). A lower value of Papp (10^{-8} cm/s) slows down the passage into milk ($C_{\max}$ of 0.43 mg/L at 19h versus 2.52 mg/L at 12h for a Papp of 10^{-7} cm/s) whereas a higher value of Papp (10^{-5} cm/s) increases the passage in the first hours after administration ($C_{\max}$ of 4.27 mg/L at 6h) (Figure 6). The low permeability of OTC (Papp= 1.4×10^{-7} cm/s) was responsible for the delay in appearance in milk (see Figure 7 and Figure 8), but also for the slow release from the IW compartment that led to an increased elimination half-life in milk (7.9h). By simulating other values of Papp for the OTC, we would have obtained similar elimination half-life values for Papp of 10^{-5} cm/s and 10^{-6} cm/s (7.4h) and a value 30% higher for Papp of 10^{-8} cm/s (9.8h). Therefore, permeability might be of importance for generalizing the PBPK model to other molecules.

4.4. Difference between cows and goats

As explained above, this generic PBPK model is intended to be used in cross-species extrapolation. It was able to satisfactorily predict milk concentrations of OTC for both cows and goats, but the predictions did not differ much between the two species. As the milk pH is almost identical between the two species (6.68 for cow and 6.65 for goat), the rate of ionization of OTC is identical in the milk of cow and goat. A key difference between cow and goat milk is the concentration of whey proteins (Balthazar et al., 2017), but as OTC has a low affinity for these proteins this difference has little impact on its binding in milk. OTC binds mainly to

ionized calcium, which is in similar concentration in both species (0.08 g/L for cow, 0.09 g/L for goat). Therefore, we did not predict any difference in the binding of OTC in milk between the two species. Finally, the main differences in milk excretion between the two species were explained by the differences in the plasma profile of OTC.

For other molecules with stronger affinities for milk components that vary between species, such as fat and protein, greater differences in milk concentrations could be observed.

4.5. Model application to estimate withdrawal period in milk

For the estimation of WP in milk we searched the literature for estimates of inter-individual variabilities (IIV) for the different parameters of the PBPK model. For some parameters the variability took into account the differences between animals of the same breed, for others it took into account the differences between breeds of the same species. For the few parameters without available experimental data, the fixed CV of 30% represents a moderate level of variability (Covington et al., 2007) while for chemical parameters, the CV of 20% represents the uncertainty of these parameters values. These CV values are well accepted in the field of PBPK modeling and are often used in recent published papers (Clewell and Clewell, 2008; Henri et al., 2017a; Li et al., 2017, 2019a; Riad et al., 2021).

For cows, the model-predicted WPs (rounded up to the next whole day) were slightly higher than the labelled milk discard time for both standard dosing regimens *i.e.* 5 days vs 4 days after 4 repeated IM injections of OTC 10 mg/kg and 4 days vs 3 days after 3 repeated IM injections OTC 5 mg/kg. These WPs are highly dependent on the prediction intervals, which were based on the IIV and uncertainty of the model parameters. The latter may have been overestimated and resulted in slightly higher estimated WPs.

For goats, predicted WPs were consistent with the labelled milk discard time for both standard dosing regimens *i.e.* 4 days after 4 repeated IM injections of OTC 10 mg/kg and 3 days after 3 repeated IM injections OTC 5 mg/kg. Because total plasma clearance is higher in goats, plasma concentrations are lower and the time that residues fall below the established MRL is reduced compared to cows. This observation was also reported by Riad *et al* (Riad et al., 2021). In addition, for goats, the labelled WP of OTC have been fixed at the WP of cow (EMA, 2016)

and do not take into account the physiology and particularities of the species. Thus an experimental study would be necessary to confirm those predicted WP in goat milk.

Overall the popPBPK model described in this study could be used as a tool to anticipate residue depletion studies. Such model does not completely replace animal studies but it can help to design such studies.

4.6. PBPK model limitations

Although this generic model accurately predicted OTC concentrations in milk of both species, it has some limitations.

First, passive diffusion is the only mechanism of drug distribution in milk that was considered in the current model. Indeed, although OTC is known to be a substrate of PgP (Schricks and Fink-Gremmels, 2007), this latter is underexpressed in the udder during lactation and does not play a role in transporting the molecule into milk (Yagdiran et al., 2016). However, other transporters that are highly expressed in the udder or whose expression increases during lactation (García-Lino et al., 2019) may have an important role in the exchange of drugs (and nutrients) between plasma and milk (Mahnke et al., 2016; Ozdemir, 2018). Further studies will be conducted with other drugs to investigate the role of active transport of molecules in milk. An influx and/or efflux clearance could then be added to equations 8, 9, and 18.

Then, the current model considers drug binding to milk components but does not vary the milk components concentrations over time, as observed in reality (Ciappesoni et al., 2011; Coulon et al., 1991). Further studies are needed to add variation over time of these parameters to this model. Similarly, changes in milk pH over time may be added to the model.

On the other hand, to build our population model we have applied variabilities and uncertainties on parameters. The choice of these parameters is not easy because data are often missing, and some parameters may be correlated thus considering independent variabilities may lead to an overestimation of the overall variability. The choice of the random effects model is critical for the determination of WP with population PBPK models. However, there is no real consensus on how to predict WP from popPBPK models. Some authors consider that the 99th percentile of the PI obtained by a population model is a good approximation of the 95th percentile of the tolerance interval, which is the criterion used by regulatory agencies, and can

therefore be used to predict a WP (Chevance, 2017; Henri et al., 2017b; Viel, 2018). In our case, the internal and external validations we have carried out give us an indication that our choice of random model was reasonable. However, the choice was very arbitrary and since it incorporates both IIV and parameter uncertainty it is difficult to determine whether the resulting interval was a prediction interval or a confidence interval.

4.7. Perspectives

In conclusion, the popPBPK model successfully predicted OTC concentrations in cow and goat milk after different doses and routes of administration. This is the first generic PBPK model to consider the udder as a permeability-limited compartment, accounting for vascular, EW, IW, alveolar and cisternal spaces, as well as passive diffusion across physiological membranes, pH, ionization and the composition of milk.

By integrating inter-individual variability in the physiological values into the model, and uncertainty in the parameters used, the model allowed for a suitable estimation of the WPs of OTC for cows and goats for different dosing regimens.

In the future, this model could be extrapolated to different drugs and chemicals, such as pesticides, with different affinities and physico-chemical properties, and to different species, such as sheep and humans, with a different milk composition and milk production.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Nouvelle Aquitaine Region and the laboratory Ceva Animal Health. We would like to acknowledge Christophe Buffet, Balladyne Tritsch, Julian Laroche, Christophe Adier, Marie-Pierre Lagree and Dominique Hurtaud-Pessel for their analytical support. We thank Emilie Wimmer, Denis Boulanger, Melaine Sauvee, Bertrand Minaud, Melanie Bouteille, Sylvie Ecalte and Jeremy Roger, the team of the agricultural high schools of Melle and Venours for the help in the realization of *in vivo* experimentations. We would additionally like to thank Thierry Vidard and Jean-Guy Rolland, for technical support.

References

- Abduljalil, K., Pansari, A., Ning, J., Jamei, M., 2021. Prediction of drug concentrations in milk during breastfeeding, integrating predictive algorithms within a physiologically-based pharmacokinetic model. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* n/a. <https://doi.org/10.1002/psp4.12662>
- Achenbach, 1998. Development of a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for oxytetracycline in cattle. *Toxicological Sciences*.
- Aktas, İ., Yarsan, E., 2017. Pharmacokinetics of Conventional and Long-Acting Oxytetracycline Preparations in Kilis Goat. *Frontiers in Veterinary Science* 4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00229>
- Alberghina, D., Casella, S., Vazzana, I., Ferrantelli, V., Giannetto, C., Piccione, G., 2010. Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (*Capra hircus*) using agarose gel electrophoresis. *Vet Clin Pathol* 39, 317–321. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00226.x>
- Ayadi, M., Caja, G., Such, X., Knight, C.H., 2003. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *J. Dairy Res.* 70, 1–7. <https://doi.org/10.1017/s0022029902005873>
- Badhan, R.K.S., Chenel, M., Penny, J.I., 2014. Development of a Physiologically-Based Pharmacokinetic Model of the Rat Central Nervous System. *Pharmaceutics* 6, 97–136. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6010097>
- Balthazar, C.F., Pimentel, T.C., Ferrão, L.L., Almada, C.N., Santillo, A., Albenzio, M., Mollakhalili, N., Mortazavian, A.M., Nascimento, J.S., Silva, M.C., Freitas, M.Q., Sant'Ana, A.S., Granato, D., Cruz, A.G., 2017. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16, 247–262. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250>
- Beal, S.L., 2001. Ways to Fit a PK Model with Some Data Below the Quantification Limit. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 28, 481–504. <https://doi.org/10.1023/A:1012299115260>
- Bobbo, T., Fiore, E., Giancesella, M., Morgante, M., Gallo, L., Ruegg, P.L., Bittante, G., Cecchinato, A., 2017. Variation in blood serum proteins and association with somatic cell count in dairy cattle from multi-breed herds. *Animal* 11, 2309–2319. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001227>
- Caja, G., Ayadi, M., Knight, C.H., 2004. Changes in cisternal compartment based on stage of lactation and time since milk ejection in the udder of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 2409–2415. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73363-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73363-9)

- Campbell, J.R., Marshall, R.T., 2016. Dairy Production and Processing: The Science of Milk and Milk Products. Waveland Press.
- Carlotti, B., Cesaretti, A., Elisei, F., 2012. Complexes of tetracyclines with divalent metal cations investigated by stationary and femtosecond-pulsed techniques. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 823–834. <https://doi.org/10.1039/C1CP22703C>
- Chemicalize - Instant Cheminformatics Solutions [WWW Document], n.d. URL <https://chemicalize.com/app/calculation/oxytetracycline> (accessed 1.29.21).
- Chen, X., Murawski, A., Patel, K., Crespi, C.L., Balimane, P.V., 2008. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm Res* 25, 1511–1520. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9517-8>
- Cheng, Y.-H., Lin, Y.-J., You, S.-H., Yang, Y.-F., How, C.M., Tseng, Y.-T., Chen, W.-Y., Liao, C.-M., 2016. Assessing exposure risks for freshwater tilapia species posed by mercury and methylmercury. *Ecotoxicology* 25, 1181–1193. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1672-4>
- Chevance, 2017. The present and future of withdrawal period calculations for milk in the European Union: focus on heterogeneous, nonmonotonic data - Chevance - 2017 - *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvp.12351> (accessed 11.8.19).
- Ciappesoni, G., JPřibyl, Milerski, M., Mareš, V., 2011. Factors affecting goat milk yield and its composition. *Czech Journal of Animal Science* 49, 465–473. <https://doi.org/10.17221/4333-CJAS>
- Clewell, R.A., Clewell, H.J., 2008. Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2007.10.012>
- Coulon, J.B., CHILLIARD, Y., Rémond, B., 1991. Effets du stade physiologique et de la saison sur la composition chimique du lait de vache et ses caractéristiques technologiques (aptitude à la coagulation, lipolyse). *INRA Productions Animales* 4, 219–228.
- Covington, T.R., Robinan Gentry, P., Van Landingham, C.B., Andersen, M.E., Kester, J.E., Clewell, H.J., 2007. The use of Markov chain Monte Carlo uncertainty analysis to support a Public Health Goal for perchloroethylene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 47, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.06.008>
- Craigmill, A.L., 2003. A physiologically based pharmacokinetic model for oxytetracycline residues in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26, 55–63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2003.00451.x>

- Craigmill, A.L., Holland, R.E., Robinson, D., Wetzlich, S., Arndt, T., 2000. Serum pharmacokinetics of oxytetracycline in sheep and calves and tissue residues in sheep following a single intramuscular injection of a long-acting preparation. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 23, 345–352.
- Craigmill, A.L., Miller, G.R., Gehring, R., Pierce, A.N., Riviere, J.E., 2004. Meta-analysis of pharmacokinetic data of veterinary drugs using the Food Animal Residue Avoidance Databank: oxytetracycline and procaine penicillin G. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 343–353.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00606.x>
- EMA, 2016. Guideline on safety and residue data requirements for pharmaceutical veterinary medicinal products intended for minor use or minor species (MUMS)/limited market 26.
- Fenneteau, F., Li, J., Nekka, F., 2009. Assessing drug distribution in tissues expressing P-glycoprotein using physiologically based pharmacokinetic modeling: identification of important model parameters through global sensitivity analysis. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 36, 495.
<https://doi.org/10.1007/s10928-009-9134-8>
- Fujikawa, M., Ano, R., Nakao, K., Shimizu, R., Akamatsu, M., 2005. Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: Application to prediction of Caco-2 cell permeability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 4721–4732. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.076>
- García-Lino, A.M., Álvarez-Fernández, I., Blanco-Paniagua, E., Merino, G., Álvarez, A.I., 2019. Transporters in the Mammary Gland-Contribution to Presence of Nutrients and Drugs into Milk. *Nutrients* 11. <https://doi.org/10.3390/nu11102372>
- Henri, J., Carrez, R., Méda, B., Laurentie, M., Sanders, P., 2017a. A physiologically based pharmacokinetic model for chickens exposed to feed supplemented with monensin during their lifetime. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40, 370–382.
<https://doi.org/10.1111/jvp.12370>
- Henri, J., Jacques, A.-M., Sanders, P., Chevance, A., Laurentie, M., 2017b. The present and future of withdrawal period calculations for milk in the European Union: dealing with data below the limit of quantification. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 40, 116–122. <https://doi.org/10.1111/jvp.12343>
- Hotham, N., Hotham, E., 2015. Drugs in breastfeeding. *Aust Prescr* 38, 156–159.
<https://doi.org/10.18773/austprescr.2015.056>
- Jamei, M., Bajot, F., Neuhoﬀ, S., Barter, Z., Yang, J., Rostami-Hodjegan, A., Rowland-Yeo, K., 2014. A Mechanistic Framework for In Vitro–In Vivo Extrapolation of Liver Membrane Transporters:

- Prediction of Drug–Drug Interaction Between Rosuvastatin and Cyclosporine. *Clin Pharmacokinet* 53, 73–87. <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0097-y>
- Jarrett, A.M., Gao, Y., Hussaini, M.Y., Cogan, N.G., Katz, D.F., 2016. Sensitivity Analysis of a Pharmacokinetic Model of Vaginal Anti-HIV Microbicide Drug Delivery. *J Pharm Sci* 105, 1772–1778. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.015>
- Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K., 1998. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* 41, 1007–1010. <https://doi.org/10.1021/jm970530e>
- Kinsella, J.E., McCarthy, R.D., 1968. Lipid composition and secretory activity of bovine mammary cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 164, 530–539. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(68\)90182-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(68)90182-3)
- Konar, A., Thomas, P.C., K.g, T., 1972. The composition of ovine mammary cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 41, 195–203. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(72\)90047-3](https://doi.org/10.1016/0300-9629(72)90047-3)
- Larson, B., 1978. *The Mammary Gland/Human Lactation/Milk Synthesis*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-11043-4>
- Lautz, L.S., Dorne, J.L.C.M., Oldenkamp, R., Hendriks, A.J., Ragas, A.M.J., 2020. Generic physiologically based kinetic modelling for farm animals: Part I. Data collection of physiological parameters in swine, cattle and sheep. *Toxicology Letters* 319, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.10.021>
- Lautz, L.S., Oldenkamp, R., Dorne, J.L., Ragas, A.M.J., 2019. Physiologically based kinetic models for farm animals: Critical review of published models and future perspectives for their use in chemical risk assessment. *Toxicology in Vitro* 60, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.05.002>
- Law, F.C.P., 1999. A Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Predicting the Withdrawal Period of Oxytetracycline in Cultured Chinook Salmon (*Oncorhynchus Tshawytscha*), in: Smith, D.J., Gingerich, W.H., Beconi-Barker, M.G. (Eds.), *Xenobiotics in Fish*. Springer US, Boston, MA, pp. 105–121. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4703-7_8
- Leavens, T.L., Tell, L.A., Kissell, L.W., Smith, G.W., Smith, D.J., Wagner, S.A., Shelver, W.L., Wu, H., Baynes, R.E., Riviere, J.E., 2014. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for flunixin in cattle (*Bos taurus*). *Food Additives & Contaminants: Part A* 31, 1506–1521. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.938363>

- Leitner, G., Merin, U., Silanikove, N., 2004. Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Goats. *Journal of dairy science* 87, 1719–26. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73325-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73325-1)
- Li, M., Cheng, Y.-H., Chittenden, J.T., Baynes, R.E., Tell, L.A., Davis, J.L., Vickroy, T.W., Riviere, J.E., Lin, Z., 2019a. Integration of Food Animal Residue Avoidance Databank (FARAD) empirical methods for drug withdrawal interval determination with a mechanistic population-based interactive physiologically based pharmacokinetic (iPBPK) modeling platform: example for flunixin meglumine administration. *Arch Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02464-z>
- Li, M., Gehring, R., Riviere, J.E., Lin, Z., 2018. Probabilistic Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Penicillin G in Milk From Dairy Cows Following Intramammary or Intramuscular Administrations. *Toxicological Sciences* 164, 85–100. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy067>
- Li, M., Gehring, R., Riviere, J.E., Lin, Z., 2017. Development and application of a population physiologically based pharmacokinetic model for penicillin G in swine and cattle for food safety assessment. *Food Chem. Toxicol.* 107, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.023>
- Li, M., Mainquist-Whigham, C., Karriker, L.A., Wulf, L.W., Zeng, D., Gehring, R., Riviere, J.E., Coetzee, J.F., Lin, Z., 2019b. An integrated experimental and physiologically based pharmacokinetic modeling study of penicillin G in heavy sows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 0. <https://doi.org/10.1111/jvp.12766>
- Lin, Z., Gehring, R., Mochel, J.P., Lavé, T., Riviere, J.E., 2016. Mathematical modeling and simulation in animal health - Part II: principles, methods, applications, and value of physiologically based pharmacokinetic modeling in veterinary medicine and food safety assessment. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 39, 421–438. <https://doi.org/10.1111/jvp.12311>
- Lin, Z., Li, M., Gehring, R., Riviere, J.E., 2015. Development and application of a multiroute physiologically based pharmacokinetic model for oxytetracycline in dogs and humans. *J Pharm Sci* 104, 233–243. <https://doi.org/10.1002/jps.24244>
- Lupton, S.J., Shappell, N.W., Shelver, W.L., Hakk, H., 2018. Distribution of Spiked Drugs between Milk Fat, Skim Milk, Whey, Curd, and Milk Protein Fractions: Expansion of Partitioning Models. *J. Agric. Food Chem.* 66, 306–314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04463>
- Mahnke, H., Ballent, M., Baumann, S., Imperiale, F., von Bergen, M., Lanusse, C., Lifschitz, A.L., Honscha, W., Halwachs, S., 2016. The ABCG2 Efflux Transporter in the Mammary Gland Mediates Veterinary Drug Secretion across the Blood-Milk Barrier into Milk of Dairy Cows. *Drug Metabolism and Disposition* 44, 700–708. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.068940>

- Martens, H., Stumpff, F., 2019. Assessment of magnesium intake according to requirement in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 103, 1023–1029.
<https://doi.org/10.1111/jpn.13106>
- McIntyre, R.T., Parrish, D.B., Fountaine, F.C., 1952. Properties of the Colostrum of the Dairy Cow. VII. pH, Buffer Capacity and Osmotic Pressure¹. *Journal of Dairy Science* 35, 356–362.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(52\)93714-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(52)93714-4)
- Mevius, D.J., Vellenga, L., Breukink, H.J., Nouws, J.F., Vree, T.B., Driessens, F., 1986. Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in piglets following intravenous and oral administration. *Vet Q* 8, 274–284. <https://doi.org/10.1080/01652176.1986.9694056>
- Nestorov, I.A., Aarons, L.J., Arundel, P.A., Rowland, M., 1998. Lumping of whole-body physiologically based pharmacokinetic models. *J Pharmacokinet Biopharm* 26, 21–46.
<https://doi.org/10.1023/a:1023272707390>
- Neville, M.C., Watters, C.D., 1983. Secretion of Calcium into Milk: Review. *Journal of Dairy Science* 66, 371–380. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81802-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81802-5)
- Ng, C.A., Hungerbühler, K., 2013. Bioconcentration of Perfluorinated Alkyl Acids: How Important Is Specific Binding? *Environ. Sci. Technol.* 47, 7214–7223. <https://doi.org/10.1021/es400981a>
- Nouws, J.F.M., Breukink, H.J., Binkhorst, G.J., Lohuis, J., van Lith, P., Mevius, D.J., Vree, T.B., 1985a. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of eight parenteral oxytetracycline-10% formulations in dairy cows. *Veterinary Quarterly* 7, 306–314.
<https://doi.org/10.1080/01652176.1985.9694004>
- Nouws, J.F.M., Vree, T.B., Termond, E., Lohuis, J., van Lith, P., Binkhorst, G.J., Breukink, H.J., 1985b. Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline after intravenous and intramuscular administration to dairy cows. *Veterinary Quarterly* 7, 296–305.
<https://doi.org/10.1080/01652176.1985.9694003>
- Oh, H., Deeth, H., 2017. Magnesium in milk. *International Dairy Journal* 71.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.03.009>
- Ozdemir, Z., 2018. Behaviours of Drugs in the Milk -A Review. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research, Special Issue: Goat and Sheep Milk* 68, 88–113.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>

- Peaker, M., Blatchford, D.R., 1988. Distribution of milk in the goat mammary gland and its relation to the rate and control of milk secretion. *Journal of Dairy Research* 55, 41–48.
<https://doi.org/10.1017/S0022029900025838>
- Peters, S.A., 2012. Physiologically-Based Modeling, in: *Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 13–16.
<https://doi.org/10.1002/9781118140291.ch2>
- Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling - 1st Edition [WWW Document], n.d. URL
<https://www.elsevier.com/books/physiologically-based-pharmacokinetic-pbpbk-modeling/fisher/978-0-12-818596-4> (accessed 7.16.21).
- Prosser, 1996. Regulation of Blood Flow in the Mammary Microvasculature. *Journal of Dairy Science* 79, 1184–1197. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76472-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76472-X)
- Reijenga, J., van Hoof, A., van Loon, A., Teunissen, B., 2013. Development of Methods for the Determination of pKa Values. *Anal Chem Insights* 8, 53–71. <https://doi.org/10.4137/ACI.S12304>
- Riad, M.H., Baynes, R.E., Tell, L.A., Davis, J.L., Maunsell, F.P., Riviere, J.E., Lin, Z., 2021. Development and Application of an interactive Physiologically Based Pharmacokinetic (iPBPK) Model to Predict Oxytetracycline Tissue Distribution and Withdrawal Intervals in Market-Age Sheep and Goats. *Toxicol Sci* kfab095. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfab095>
- Rodgers, T., Leahy, D., Rowland, M., 2005. Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. *J Pharm Sci* 94, 1259–1276.
<https://doi.org/10.1002/jps.20322>
- Rodgers, T., Rowland, M., 2006. Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions. *J Pharm Sci* 95, 1238–1257.
<https://doi.org/10.1002/jps.20502>
- Ross, D.L., Riley, C.M., 1993. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials V. Effect of fluoroquinolone structure and pH on the complexation of various fluoroquinolones with magnesium and calcium ions. *International Journal of Pharmaceutics* 93, 121–129.
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90170-K](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90170-K)
- Rule, R., Moreno, L., Serrano, J., Roman, A.G., Moyano, R., Garcia, J., 2001. Pharmacokinetics and residues in milk of oxytetra-cyclines administered parenterally to dairy goats. *Australian Veterinary Journal* 79, 492–496. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb13023.x>

- Saltelli, A., Bolado, R., 1998. An alternative way to compute Fourier amplitude sensitivity test (FAST). *Computational Statistics & Data Analysis* 26, 445–460. [https://doi.org/10.1016/S0167-9473\(97\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S0167-9473(97)00043-1)
- Schricks, J., Fink-Gremmels, J., 2007. P-glycoprotein-mediated transport of oxytetracycline in the Caco-2 cell model. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 25–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00808.x>
- Shanler, M.S., Mason, A.K., Crocker, R.M., Vardaro, R., Crespi, C.L., Stresser, D.M., Perloff, E.S., 2021. Automation of Corning® BioCoat™ Pre-coated PAMPA Plates Improves Predictability, Reproducibility, and Efficiency 5.
- Shappell, N., Shelver, W., Lupton, S., Fanaselle, W., Doren, J., Hakk, H., 2017. Distribution of Animal Drugs among Curd, Whey, and Milk Protein Fractions in Spiked Skim Milk and Whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04258>
- Snipes, M.B., Lengemann, F.W., 1972. Tissue Composition of Lactating Guinea Pig Mammary Glands. *Journal of Dairy Science* 55, 1783–1786. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(72\)85758-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(72)85758-8)
- Stephens, C.R., Murai, K., Brunings, K.J., Woodward, R.B., 1956. Acidity Constants of the Tetracycline Antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4155–4158. <https://doi.org/10.1021/ja01597a081>
- Szegezdi, J., Csizmadia, F., 2007. A method for calculating the pKa values of small and large molecules.
- Szegezdi, J., Csizmadia, F., 2004. Prediction of dissociation co...
- Thompson, G.E., 1980. The distribution of blood flow in the udder of the sheep and changes brought about by cold exposure and lactation. *J Physiol* 302, 379–386.
- Tongaree, S., Flanagan, D.R., Poust, R.I., 1999. The Effects of pH and Mixed Solvent Systems on the Solubility of Oxytetracycline. *Pharmaceutical Development and Technology* 4, 571–580. <https://doi.org/10.1081/PDT-100101396>
- Upton, R.N., 2008. Organ weights and blood flows of sheep and pig for physiological pharmacokinetic modelling. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.08.001>
- Vestweber, J.G., Al-Ani, F.K., 1984. Udder edema: biochemical studies in Holstein cattle. *Cornell Vet* 74, 366–372.
- Viel, A., 2018. A Population WB-PBPK Model of Colistin and its Prodrug CMS in Pigs: Focus on the Renal Distribution and Excretion | SpringerLink [WWW Document]. URL <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11095-018-2379-4> (accessed 1.15.19).

- Waddell, W.J., Bates, R.G., 1969. Intracellular pH. *Physiol Rev* 49, 285–329.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1969.49.2.285>
- Whittem, T., 2012. Modelling the concentration–time relationship in milk from cattle administered an intramammary drug. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 35, 460–471.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01352.x>
- WHO, 2010. Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment, Harmonization project document. World Health Organization, Geneva.
- Woodward, A.P., Whittem, T., 2019. Physiologically based modelling of the pharmacokinetics of three beta-lactam antibiotics after intra-mammary administration in dairy cows. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* <https://doi.org/10.1111/jvp.12812>
- Yagdiran, Y., Oskarsson, A., Knight, C.H., Tallkvist, J., 2016. ABC- and SLC-Transporters in Murine and Bovine Mammary Epithelium - Effects of Prochloraz. *PLOS ONE* 11, e0151904.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151904>
- Yau, E., Olivares-Morales, A., Gertz, M., Parrott, N., Darwich, A.S., Aarons, L., Ogungbenro, K., 2020. Global Sensitivity Analysis of the Rodgers and Rowland Model for Prediction of Tissue: Plasma Partitioning Coefficients: Assessment of the Key Physiological and Physicochemical Factors That Determine Small-Molecule Tissue Distribution. *AAPS J* 22, 41. <https://doi.org/10.1208/s12248-020-0418-7>
- Ziv, G., Bogin, E., Shani, J., G. Sulman, F., 1974. Penetration of radioactive-labeled antibiotics from blood serum into milk in normal and mastitic ewes. *Annales de Recherches Vétérinaires* 5, 15–28.
- Ziv, G., Sulman, F.G., 1975. Absorption of antibiotics by the bovine udder. *J. Dairy Sci.* 58, 1637–1644.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84762-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84762-X)
- Ziv, G., Sulman, F.G., 1972. Binding of Antibiotics to Bovine and Ovine Serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2, 206–213. <https://doi.org/10.1128/AAC.2.3.206>

5.3. Comparaison des profils cinétiques de quatre antibiotiques dans le lait de trois espèces de production

5.3.1. Introduction

Au cours de cette thèse, des données expérimentales ont été générées sur quatre antibiotiques administrés à deux ou trois espèces animales. Les résultats présentés ci-dessous sont considérés comme des travaux préliminaires vis-à-vis de l'objectif principal : l'application du modèle PBPK générique à différentes molécules et espèces.

5.3.2. Démarche scientifique

❖ Molécules

Les quatre antibiotiques étudiés : l'amoxicilline, la marbofloxacin, l'oxytétracycline et la spiramycine, ont été choisis car ils possèdent des caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques distinctes (voir Tableau 2). Chaque molécule appartient à une famille antibiotique différente. Leurs structures chimiques ainsi que leur principal pKa (le groupement chimique le plus fort) sont présentés Figure 24.

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques des quatre antibiotiques : amoxicilline, marbofloxacin, oxytétracycline et spiramycine.

	Amoxicilline (trihydrate)	Marbofloxacin	Oxytétracycline (hydrochloride)	Spiramycine
Famille	Beta-lactame	Fluoroquinolone	Tétracycline	Macrolide
Formule chimique	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S (+ 3* H ₂ O)	C ₁₇ H ₁₉ FN ₄ O ₄	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ (+ CL ⁻ + H ⁺)	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄
PM (g/mol)	365,4 (+18)	362,4	460,4 (+36)	843,1
log P	-2,3	-0,6	-4,5	2,5
principal pKa	3,23 (acide)	5,28 (acide)	7,25 (acide)	9,33 (base)
% ionisé (matrice)	100 (plasma et lait)	99 (plasma) 96 (lait)	60 (plasma) 22 (lait)	99 (plasma) 100 (lait)
Transporteurs	PepT1 ¹ PepT2 ²	BCRP ³	P-gP ⁴ OATs ⁵	BCRP, P-gP, MRP2 ⁶

Note: % : pourcentage

¹(Terada *et al.*, 1997) ; ²(Luckner and Brandsch, 2005) ; ³(González-Lobato *et al.*, 2014) ⁴(Schrickx and Fink-Gremmels, 2007) ; ⁵(Babu *et al.*, 2002) ; ⁶(Tian *et al.*, 2007)

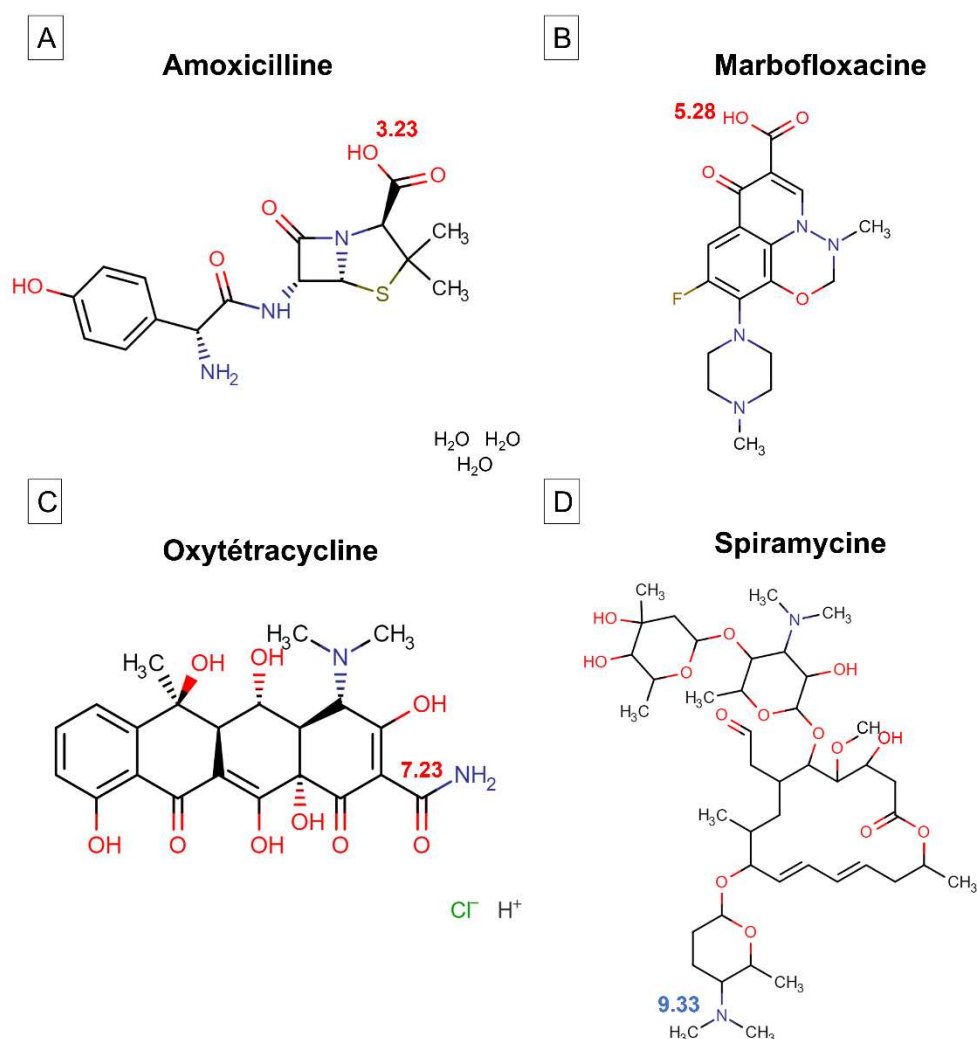


Figure 24: Structure chimique des quatre antibiotiques et le pKa de leur principale fonction acide (en rouge) ou basique (en bleu). (*Chemicalize*)

❖ Expérimentations animales

Chaque antibiotique a été administré en dose unique par voie IM à des vaches Prim Holstein (n=6 par molécule), des chèvres Alpine et croisées (n=6 par molécule) ; l'amoxicilline et la spiramycine ont été administrées également à des brebis Lacaune (n=6 par molécule). La dose a été ajustée au poids de l'animal et suit les posologies recommandées dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) de chaque spécialité vétérinaire :

- ❖ Marbofloxacin (Marbocyl 10 % ®) à 2 mg/kg,
- ❖ Oxytétracycline (Terramycine®) à 10 mg/kg,
- ❖ Spiramycine (Spirovet®) à 30 000 IU/kg (équivalent à 10 mg/kg),
- ❖ Amoxicilline (Vetrimoxin®) à 15 mg/kg.

Les TB et TP du lait ont été déterminés par la laiterie avant l'administration de l'antibiotique pour les chèvres (contrôle laitier), par le robot de traite pendant les traites pour les vaches et par dosage infrarouge via un laboratoire externe avant administration pour les brebis. La concentration de cellules dans le lait a été mesurée par le robot de traite pour les vaches par une technique de lecture optique, lors du contrôle laitier pour les chèvres par une technique de lecture optique et par cytométrie pour les brebis. Pour les vaches, les chèvres et la moitié des brebis (n=3), les traites se sont déroulées deux fois par jour (le matin et le soir, avec un intervalle de jour de 8h et de nuit de 16h) et ont permis de récolter des échantillons de lait (30 ml provenant de tous les quartiers) jusqu'au TA réglementaire plus un jour (ou 7 jours forfaitaires plus un jour pour l'espèce mineure, la chèvre). Pour l'autre moitié des brebis (n=3), les traites se sont déroulées une fois par jour (le matin). Le volume total de lait produit a été mesuré individuellement à chaque traite pour toutes les espèces. Les échantillons ont été stockés à -20°C jusqu'au dosage.

Des échantillons répétés de sang (5 ml) ont été prélevés *via* la veine jugulaire à 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 et 8 heures le premier jour après l'administration du médicament, puis deux fois par jour (en même temps que les traites) pendant une période égale à 4 fois la demi-vie terminale du médicament dans le sang (selon la valeur la plus élevée trouvée dans la littérature). Dans les 30 minutes suivant le prélèvement, les échantillons de sang ont été centrifugés à 3500 rpm pendant 10 minutes afin de récupérer le plasma. Les échantillons ont été stockés à -20°C jusqu'au dosage.

La méthodologie expérimentale est résumée Figure 25.

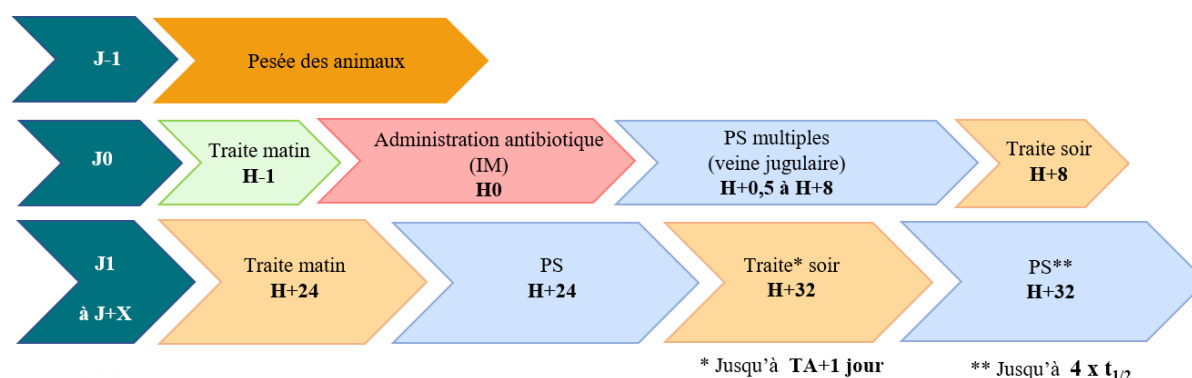


Figure 25: Processus expérimental. J pour jour, H pour heure, IM pour intramusculaire, PS pour prise de sang, TA pour temps d'attente.

❖ **Dosages**

Les méthodes de dosage développées et validées pour chaque molécule et chaque matrice sont résumées Tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques des méthodes de dosage des quatre antibiotiques dans le plasma et le lait des trois espèces.

Molécule	Matrice	Système	Caractéristiques	Range (L _{LOQ} -U _{LOQ})
Amoxicilline	Plasma	LC-MS/MS	Transition: 366,1 → 113,93	0,01 µg/ml 1 µg/ml
	Lait	LC-MS/MS	Transition: 366,1 → 113,93	1 µg/kg 20 µg/kg
Marbofloxacin	Plasma	HPLC- Détecteur de fluorescence	Excitation: 299 nm Emission: 505 nm	0,02 µg/ml 10 µg/ml
	Lait	HPLC- Détecteur de fluorescence	Excitation: 299 nm Emission: 505 nm	15 µg/kg 750 µg/kg
Oxytétracycline	Plasma	HPLC- Détecteur UV	Longueur d'onde: 355 nm	0,05 µg/ml 15 µg/ml
	Lait	LC-MS/MS HESI positif	Transition: 461,1 → 426,16	20 µg/kg 1000 µg/kg
Spiramycine	Plasma	LC-MS/MS, HESI positif	Transition [M+2H] ²⁺ : 422,1 → 174,1	0,02 µg/ml 5 µg/ml
	Lait	LC-MS/MS, HESI positif	Transition [M+2H] ²⁺ : 422,1 → 174,1	40 µg/kg 2000 µg/kg

Notes: LC-MS/MS: chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem ; HPLC: chromatographie liquide à haute performance ; UV: ultra violet ; L_{LOQ}: limite faible de quantification ; U_{LOQ}: limite haute de quantification.

❖ **Analyses non-compartmentales**

Des analyses non-compartmentales (NCA) ont été réalisées sur l'ensemble des molécules et des espèces grâce au logiciel Pkanalix® (version 2020R1. Antony, France : Lixoft SAS, 2020). Les paramètres PK secondaires tels que les demi-vies d'élimination plasmatique ($t_{1/2, \text{plasma}}$) et laitière ($t_{1/2, \text{lait}}$) et les AUC dans le plasma et le lait, ainsi que les ratios d'AUC_{0-infini} : M/P et le pourcentage de la dose excrétée dans le lait ont été déterminés. Plus précisément :

- l'AUC a été estimée par la méthode des trapèzes linéaire/logarithmique (linéaire pour les concentrations croissantes et logarithmique pour les concentrations décroissantes). L'interpolation avec la première concentration observée dans le lait (T8h) est linéaire tandis

que l'extrapolation suivant la dernière concentration dans le plasma et le lait est logarithmique. Lorsque l'extrapolation de l'AUC entre le dernier point de mesure et l'infini était inférieure à 20%, l'AUC_{0-infini} a été reportée. Dans le cas contraire, seule l'AUC_{last} (jusqu'au dernier point observé) a été reportée et le ratio M/P n'a pas été calculé.

➤ les demi-vies d'élimination dans le plasma et le lait ont été reportées si le R² ajusté (prenant en compte le nombre de points inclus) était supérieur à 0,8.

❖ Expérimentations de perméabilité transcellulaire

Des expérimentations *in vitro* ont été réalisées en collaboration avec les Universités d'Utrecht et de Leipzig sur des membranes perméables artificielles PAMPA afin d'estimer la diffusion passive (transcellulaire) des différentes molécules à travers la barrière sang-lait (Chen *et al.*, 2008).

Le système PAMPA est décrit section 1.4.3.1 Pour chaque antibiotique, 300 µL de solution (du composé d'intérêt) ont été ajoutés dans les puits de la plaque donneuse et 200 µL de PBS ont été ajoutés dans les puits de la plaque de filtration (pré-recouverte de lipides). Les plaques superposées ont ensuite été incubées pendant quatre heures à température ambiante puis des échantillons de 100 µL ont été prélevés dans chaque puit et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse. La méthode de dosage utilisée pour ces échantillons est la même que celle utilisée pour les échantillons de plasma (avec une adaptation de la fonction de réponse d'un modèle linéaire à un modèle quadratique).

Après analyse des échantillons, la perméabilité des différents antibiotiques a été calculée à l'aide de l'Eq.1 détaillée dans la section 1.4.3.1.

❖ Expérimentations d'efflux de la marbofloxacin

Des études préliminaires *in vitro* réalisées à l'Université de Leipzig (non publiées) ont été menées afin d'identifier si la marbofloxacin est substrat de la BCRP_{bovine}.

Des cellules MDCKII ont été transfectées avec de l'ADNc de la BCRP_{bovine}, isolé de glande mammaire bovine. Le test du Hoechst 33342 a été réalisé pour évaluer l'interaction entre la marbofloxacin et la BCRP. Le Hoechst 33342 est un colorant fluorescent qui diffuse passivement dans les cellules et est ensuite activement sécrété par des transporteurs d'efflux tels que la BCRP (Wassermann, Halwachs, Lindner, *et al.*, 2013). En principe, l'accumulation

intracellulaire du Hoechst 33342 en présence du composé d'intérêt révèle une compétition de substrat avec le transporteur, empêchant ainsi l'efflux du colorant hors de la cellule. Lors de ces expérimentations, les cellules MDCKII-BCRP_{bovine} ont été incubées avec des concentrations croissantes de marbofloxacin (0,5 à 6 µg/ml), pendant 4 heures.

5.3.3. Résultats

❖ Expérimentations animales

Les caractéristiques démographiques des animaux de l'étude (moyenne $\pm$ SD) sont présentées Tableau 4. Pour les vaches, 6 animaux différents ont été traités avec chaque molécule (n=24) ; pour les chèvres, 12 individus ont été séparés en 4 groupes et chaque groupe (n=3 par groupe) a été traité avec un antibiotique. Après un wash-out de 2 mois, 4 nouveaux groupes ont été formés à partir de ces même 12 animaux et chaque groupe a été traité avec un antibiotique différent de celui de la première expérience ; pour les brebis, les 2 antibiotiques (amoxicilline puis spiramycine) ont été administrés sur les même 6 animaux avec un wash-out de 7 jours.

Tableau 4 : Caractéristiques démographiques des vaches (n=24), des chèvres (n=12) et des brebis (n=6) de l'étude (moyenne $\pm$ SD). Les données ont été recueillies avant chaque expérimentation.

	Vaches	Chèvres	Brebis
Race	Prim' Holstein	Alpine (n=9) Croisée (n=3)	Lacaune
Age (années)	4 + 1,5	NA	NA
Nombre de lactations	2 + 1,2	NA	NA
Jours de lactation	274 $\pm$ 43	245 $\pm$ 29	125 $\pm$ 81
Poids (kg)	539 $\pm$ 50	67 $\pm$ 6,1	66 $\pm$ 5,2
Production de lait quotidienne (kg)	20,8 + 3,7	3,2 $\pm$ 0,8	3,0 $\pm$ 0,5 (bi) 1,8 $\pm$ 0,5 (mo)
Taux butyrique (%)	39 $\pm$ 13	36 $\pm$ 4,0	NC
Taux protéique (%)	31 $\pm$ 10	33 $\pm$ 2,3	NC
Nombre de cellules dans le lait (*1000 par ml)	125 $\pm$ 128	2074 $\pm$ 806	196 $\pm$ 140
Statut clinique	Saines		

Notes : NA : pas de données ; NC : non calculable ; Bi : bi-traite ; Mo : monotraite

Les caractéristiques démographiques des animaux montrent que les vaches et les chèvres étaient à un stade de lactation avancé (>240 jours) tandis que les brebis étaient à un stade plus précoce

(125 jours). La production quotidienne moyenne était de 21 kg, 3 kg et 3 kg pour les vaches, chèvres et brebis (bi-traite), respectivement. Les chèvres produisaient un lait légèrement plus riche en protéines et moins gras que les vaches. Les vaches et les brebis avaient une concentration de cellules dans le lait bien inférieure à celle des chèvres de cette étude.

❖ Analyses non-compartmentales

Les résultats principaux de la NCA (moyenne $\pm$ SD) sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Résultats de l'analyse non-compartmentale (moyenne $\pm$ SD) des quatre antibiotiques dans le plasma et le lait de chèvre, vache et brebis.

		Amoxicilline	Marbofloxacin	Oxytétracycline	Spiramycine
Vache	M/P	0,019 $\pm$ 0,018	0,84 $\pm$ 0,16	0,74 $\pm$ 0,12	46 $\pm$ 11
	% dose	0,002 $\pm$ 0,001	0,2 $\pm$ 0,08	0,8 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 1,1
	t _{1/2,lait} (h)	6,1 $\pm$ 2,2 ^a	4,3 $\pm$ 0,09 ^a	10,9 $\pm$ 2,5	38,6 $\pm$ 8,3
	t _{1/2,plasma} (h)	6,3 $\pm$ 2,3	3,9 $\pm$ 0,5	9,1 $\pm$ 1,0	9,8 $\pm$ 1,9
Chèvre	M/P	0,023 $\pm$ 0,013	NC	0,50 $\pm$ 0,11	50 $\pm$ 13
	% dose	0,002	0,2 $\pm$ 0,09	0,5 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,8
	t _{1/2,lait} (h)	11,8 $\pm$ 2,9 ^a	NC	11,3 $\pm$ 7,6	17,7 $\pm$ 2,0
	t _{1/2,plasma} (h)	6,4 $\pm$ 3,6	6,2 $\pm$ 1,1	6,4 $\pm$ 1,7	10,5 $\pm$ 3,6
Brebis	M/P	0,20 $\pm$ 0,23	NA	NA	51 $\pm$ 15
	% dose	0,02 $\pm$ 0,01 (Bi) 0,002 $\pm$ 0,0 (Mo)			2,5 $\pm$ 1,6 (Bi) 0,4 $\pm$ 0,4 (Mo)
	t _{1/2,lait} (h)	7,4 $\pm$ 2,5			29,3 $\pm$ 6,5
	t _{1/2,plasma} (h)	10,0 $\pm$ 6,5			11,9 $\pm$ 1,6

Notes: M/P: ratio lait plasma ; % dose: pourcentage de la dose excrété dans le lait ; NA: pas de données ; NC : non calculable ; Bi : bi-traite ; Mo : monotraite ; ^acalculées avec 2 points.

Il est à noter que pour la marbofloxacin (chez la vache) et l'amoxicilline (chez la vache et la chèvre), les concentrations dans le lait sont rapidement inférieures à la LLOQ et leur t_{1/2,lait} ont été calculées avec seulement deux points. Pour les autres molécules et espèces, l'AUC_{last-infini} extrapolée était inférieure à 20%, le R² ajusté était supérieur à 0,8 et les t_{1/2} ont été calculées avec au moins 3 points.

❖ Cinétiques des quatre molécules dans le plasma et le lait des différentes espèces

Les cinétiques des quatre antibiotiques dans le plasma et le lait des vaches, chèvres et brebis (pour l'amoxicilline et la spiramycine) sont présentées Figure 26.

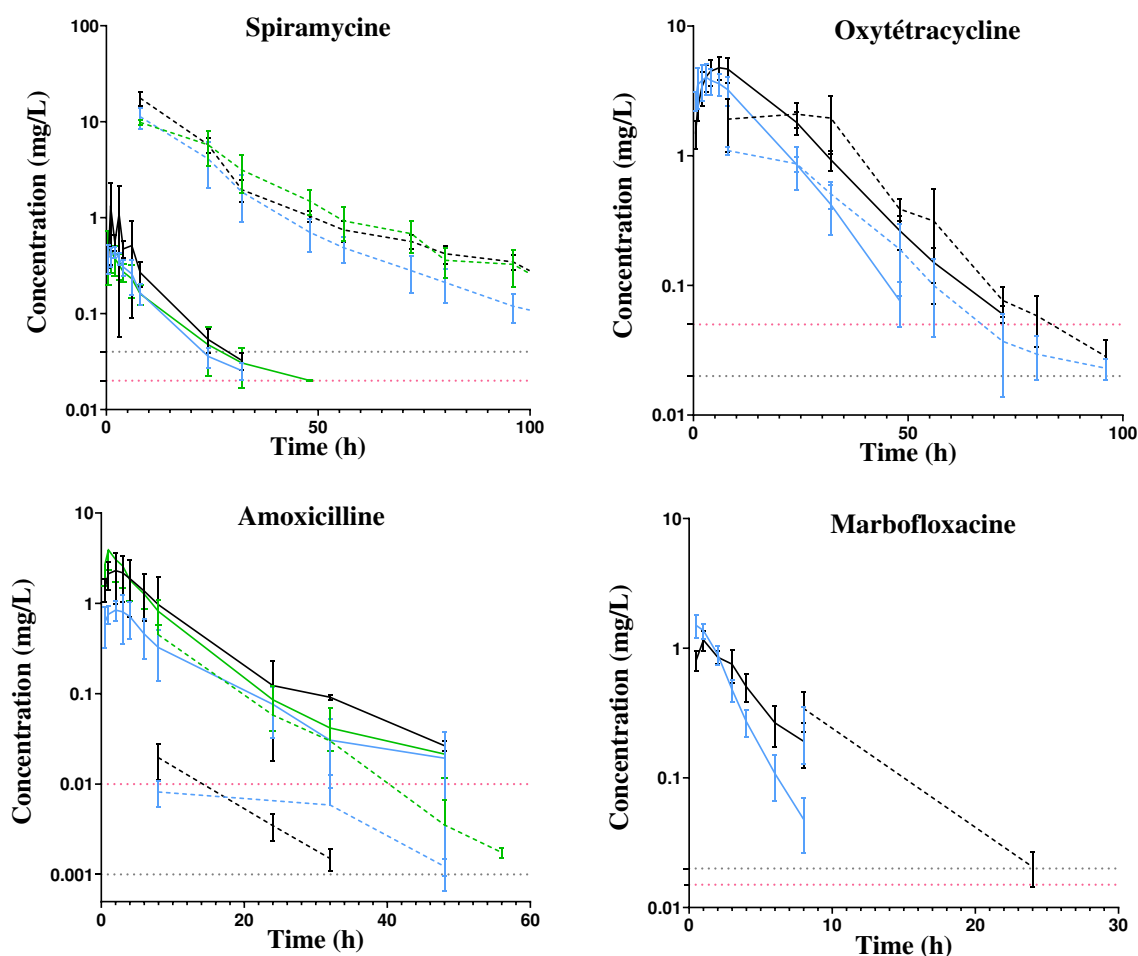


Figure 26: Concentrations plasmatiques (courbes pleines, moyenne $\pm$ SD) et laitières (courbes pointillées) des quatre antibiotiques en fonction du temps chez les vaches (noir), les chèvres (bleu) et les brebis (vert). Les limites basses de quantification (LLOQ) sont représentées en ligne pointillée rose pour le plasma et grise pour le lait.

Comme observé Figure 26 et Tableau 5, les ratios M/P sont très différents en fonction des molécules, allant en moyenne de 0,019 pour l'amoxicilline à 46 pour la spiramycine (pour les vaches).

Pour l'oxytétracycline et la marbofloxacin, les profils cinétiques dans le plasma et le lait sont proches, pour chaque espèce. Cependant, pour la spiramycine, les concentrations dans le lait sont bien supérieures à celles dans le plasma (M/P d'environ 50 quelle que soit l'espèce) tandis que pour l'amoxicilline les concentrations dans le lait sont nettement inférieures à celles dans le plasma (M/P de 0,02 à 0,2 selon l'espèce). On peut également remarquer que, tandis que les $t_{1/2}$ dans le plasma et le lait sont proches pour l'oxytétracycline, la marbofloxacin et

l'amoxicilline, concernant la spiramycine la $t_{1/2}$ dans le lait est significativement plus longue que dans le plasma (voir Tableau 5).

Pour une même molécule, il y a peu de différences entre les espèces (courbes des concentrations superposées), excepté pour l'amoxicilline où le ratio M/P est multiplié par un facteur d'environ 10 chez les brebis par rapport à celui des deux autres espèces (0,20 vs 0,019 pour la vache et 0,023 pour la chèvre). Pour la spiramycine, la $t_{1/2, \text{lait}}$ chez la chèvre (18 h) est inférieure d'un facteur 2 et 1,6 aux $t_{1/2, \text{lait}}$ chez la vache (39 h) et la brebis (29 h).

❖ Expérimentations de perméabilité transcellulaire

Les résultats des expérimentations *in vitro* PAMPA (moyenne $\pm$ SD) sont présentés dans le Tableau 6. Les quatre antibiotiques possèdent une faible perméabilité transcellulaire, variant de $2,3 \cdot 10^{-8}$ cm/s pour l'amoxicilline à $4,0 \cdot 10^{-7}$ cm/s pour la marbofloxacin.

Tableau 6 : Résultats de perméabilité transcellulaire (moyenne $\pm$ SD) des quatre antibiotiques estimée par le système *in vitro* de membrane artificielle (PAMPA).

	Amoxicilline	Marbofloxacin	Oxytétracycline	Spiramycine
Papp (cm/s)	$2,3 \cdot 10^{-8}$ $\pm 0,22 \cdot 10^{-8}$	$4,0 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,48 \cdot 10^{-7}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,19 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$ $\pm 0,32 \cdot 10^{-7}$

Note : n=3 pour tous les antibiotiques sauf amoxicilline où n=2.

❖ Expérimentations d'efflux de la marbofloxacin

Les résultats de l'étude de l'interaction entre la marbofloxacin et la BCRP_{bovine} sont présentés Figure 27.

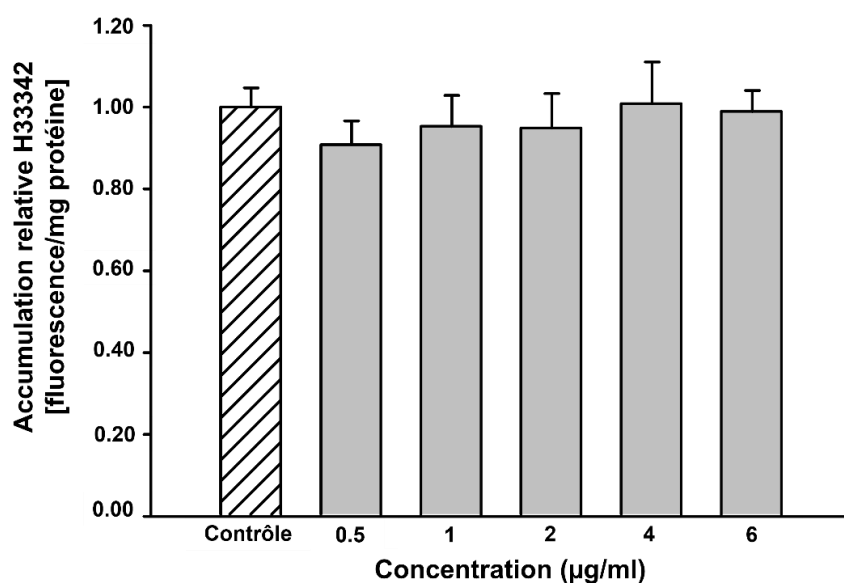


Figure 27: Résultats du test d'accumulation de Hoechst 33342 dans des cellules MDCKII transfectées avec BCRP_{bovine} en présence de concentrations croissantes de marbofloxacin (5 expériences indépendantes avec n=25 réplicats chacune).

Ces résultats ne montrent aucune accumulation significative de Hoechst 33342 dans les cellules exprimant la BCRP par rapport au contrôle (cellules MDCKII-MOCK, n'exprimant pas la protéine BCRP), il n'y a donc pas d'interaction entre la marbofloxacin et la BCRP_{bovine}, et par conséquent aucun transport actif significatif de la marbofloxacin par la BCRP_{bovine}.

5.3.4. Discussion et perspectives

L'objectif de ces expérimentations était de pouvoir comparer les cinétiques de diverses molécules dans le lait de plusieurs espèces animales.

❖ Expérimentations animales

D'après les caractéristiques démographiques des animaux de cette étude, le lait des chèvres était légèrement moins gras que celui des vaches, ce qui est contradictoire avec les données de la littérature (Balthazar *et al.*, 2017). Cette faible différence est probablement liée au faible nombre d'animaux utilisé dans l'expérimentation (12 chèvres et 24 vaches) et aux différences de stade de lactation. La concentration de cellules mesurée dans le lait de vache était inférieure au seuil européen de 400 000 cellules/ml, ce qui indique que les vaches n'avaient pas de mammite clinique. Les brebis possédaient également un nombre de cellules/ml, inférieur au seuil de 500 000 cellules /ml (Puggioni *et al.*, 2020). A l'inverse, en moyenne, les chèvres

avaient une concentration de cellules bien supérieure aux deux autres espèces (2074 vs 125 et 196 * 1000 cellules par ml), dépassant le seuil de 750 000 cellules/ml pour une mammite subclinique et celui de 2 millions de cellules par ml (pour 50% des animaux) pour une mammite clinique (Novac and Andrei, 2020). Cependant aucun signe clinique n'a été observé chez les chèvres. Cette concentration élevée de cellules peut être liée à l'entretien de la machine de traite et à son réglage (trop grande pression sur la mamelle, nombre de pulsation par min trop élevé, circuit du lait) ou à une mauvaise hygiène des trayons qui pourrait contaminer le lait. De plus, le degré de précision de la méthode utilisée pour énumérer les cellules impacte énormément les résultats. Enfin, la production de lait quotidienne des trois espèces est cohérente avec les productions moyennes habituelles (Guth, 2016).

❖ **Comparaison à la littérature**

Tout d'abord, les paramètres PK mesurés ont été comparés aux données de la littérature. Pour l'amoxicilline, Ozdemir *et al* ont calculé un ratio M/P moyen de 0,46 et une $t_{1/2\text{lait}}$ de 2,6 h (et 6 h dans le plasma) chez des vaches de la même race (Ozdemir *et al.*, 2018). Les différences observées avec nos paramètres (M/P de 0,019 et $t_{1/2\text{lait}}$ de 6h) peuvent être expliquées par les différents schémas de prélèvement utilisés. En effet, leur cinétique dans le lait a été réalisée sur 12 h avec des prélèvements multiples (15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h ; sans vider la mamelle) tandis que notre cinétique a été réalisée sur 32h, avec des prélèvements uniquement aux moments des traites (à 8h, 24h et 32h ; en vidant entièrement la mamelle). A notre connaissance, c'est la seule étude où un ratio M/P a été calculé pour l'amoxicilline dans une espèce laitière. Pour la marbofloxacin, des ratios M/P de 0,9 (vs non calculable dans notre étude) chez la chèvre et 0,84 chez la vache ont été reportés (vs 0,84 dans notre étude) (Schneider *et al.*, 2004; Lorenzutti *et al.*, 2017). Les $t_{1/2\text{lait}}$ mesurées sont de 4,59 h chez la vache et 3,11 h chez la chèvre (vs 4,3 h dans notre étude). Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux espèces et confirment nos résultats. Pour l'oxytétracycline, Rule *et al* ont calculé le même pourcentage de la dose excrété (0,5%, comme dans notre étude) et une $t_{1/2\text{lait}}$ de 15,6 h (vs 11 h dans notre étude) chez la chèvre après une administration IM de 20 mg/kg (Rule *et al.*, 2001). Leur ratio M/P est de 0,79 (vs 0,5 dans notre étude), une différence qui pourrait être expliquée par la sensibilité de la méthode de dosage, avec des concentrations qui passent sous la LLOQ (0,5 µg/ml vs 0,05 µg/ml dans notre étude) à 72 h contre 96 h dans notre étude. Enfin, pour la spiramycine, un ratio M/P de 62 (vs 46 dans notre étude), des $t_{1/2\text{lait}}$

de 39 h et 61 h (vs 39 h) et des valeurs de 4% et 5,7% de la dose excrétée (vs 5%) ont été rapportées chez la vache (Sanders *et al.*, 1992; Renard *et al.*, 1996). La différence du ratio M/P peut être liée à la méthode de dosage (LLOQ plus élevée) ou à l'état pathologique des vaches qui étaient atteintes de mammite (Renard *et al.*, 1996). La méthode de dosage microbiologique peut également expliquer les différences de demi-vie dans le lait (Sanders *et al.*, 1992).

❖ Comparaison inter-molécules

Dans ces analyses préliminaires, l'oxytétracycline et la marbofloxacin présentent des profils dans le lait proches des profils plasmatiques, tandis que la spiramycine et l'amoxicilline ont des profils très différents. Pour ces deux-dernières molécules, le ratio M/P est fortement différent de 1. Ces résultats suggèrent qu'un transport actif pourrait être en cause soit dans l'efflux vers le lait pour l'une, soit dans la réabsorption dans le plasma pour l'autre. Une étude chez la souris a montré que la spiramycine est substrat de la BCRP (Tian *et al.*, 2007). La BCRP étant fortement exprimée pendant la lactation, elle contribue à l'efflux de ses substrats dans le lait (Jonker *et al.*, 2005), et au vu du fort ratio M/P de la spiramycine, il est possible qu'elle ait un rôle dans cette forte excrétion dans le lait. L'amoxicilline, elle, est substrat du transporteur PepT2 (Luckner and Brandsch, 2005) qui est également surexprimé lors de la lactation (Gilchrist and Alcorn, 2010). A l'inverse de la BCRP, il joue un rôle dans la réabsorption de ses substrats du lait vers le tissu (localisation apicale) et pourrait ainsi expliquer le très faible ratio M/P de l'amoxicilline.

A l'inverse des deux antibiotiques précédemment discutés, la marbofloxacin (chez la vache) et l'oxytétracycline (chez la vache et la chèvre) ont un ratio M/P proche de 1. Ce résultat est en faveur d'une diffusion passive de ces molécules dans le lait, les faibles différences d'AUC entre le lait et le plasma s'expliquant par d'éventuelles différences d'ionisation, de fixation protéique dans les deux milieux ou aux incertitudes liées à la méthode d'estimation du ratio M/P (incertitudes expérimentales, d'estimation des AUC par analyse non compartimentale). L'OTC est substrat de la P-gP et de certains OATs (Babu *et al.*, 2002; Schrickx and Fink-Gremmels, 2007). Cependant la P-gP est fortement sous-exprimée lors de la lactation (Alcorn *et al.*, 2002; Gilchrist and Alcorn, 2010) et n'influence pas l'efflux de la molécule dans le lait ; et le rôle des OATs dans la glande mammaire est peu connu (García-Lino *et al.*, 2019). Pour la marbofloxacin, les concentrations dans le lait sont rapidement inférieures à la LLOQ (pour la chèvre, seule la concentration à T8h est >LLOQ) et empêchent une bonne estimation des

paramètres dans le lait (M/P et $t_{1/2, \text{lait}}$). Les résultats de l'étude de l'interaction entre la marbofloxacin et la BCRP sont en accord avec le ratio M/P proche de 1 calculé à partir des données observées *in vivo* (voir Tableau 5). Gonzalez *et al* ont montré un faible transport de la marbofloxacin par la BCRP : le rapport d'efflux transcellulaire est 2 fois supérieur dans les cellules MDCKII (*Madin Darby Canine Kidney Cells*) exprimant la BCRP par rapport aux cellules parentales qui n'expriment pas la protéine (González-Lobato *et al.*, 2014). Ce résultat est faible par rapport à celui des autres molécules testées dans l'article (Orbifloxacin, ratio de 6 ; Danofloxacin : ratio de 12). De plus, ces écarts peuvent s'expliquer par les différences de protocole et de mesure de l'interaction (mesures à 2h et à 4h).

❖ Expérimentations de perméabilité transcellulaire

Les expérimentations sur la membrane artificielle PAMPA ont montré que les quatre molécules ont une perméabilité transcellulaire faible et du même ordre de grandeur sauf pour l'amoxicilline avec une perméabilité environ 10 fois plus faible (Tableau 6 : amoxicilline $\ll$ spiramycine $<$ oxytétracycline $\approx$ marbofloxacin). Cette perméabilité dépend du caractère lipophile ($\log P$), du PM, de l'état d'ionisation et de la fraction libre de la molécule (Chillistone and Hardman, 2014). Comme observé dans le Tableau 2, l'amoxicilline est totalement ionisée dans le plasma ce qui l'empêche de traverser les membranes par diffusion passive. Malgré sa lipophilie, la spiramycine possède un fort PM et une forte ionisation, deux facteurs qui ne sont pas en faveur d'une diffusion passive. L'oxytétracycline est moins ionisée dans le sang que les trois autres molécules (60% vs 99-100%), ce qui favorise sa diffusion passive comparée à l'amoxicilline et la spiramycine. La marbofloxacin, enfin, possède la P_{app} la plus élevée des quatre molécules, probablement dû à son caractère plus lipophile que l'amoxicilline et l'oxytétracycline, et à son PM nettement plus faible que celui de la spiramycine.

❖ Comparaison inter-espèces

L'amoxicilline est la seule molécule pour laquelle on observe une différence importante de cinétique dans le lait entre les trois espèces. En effet, le ratio M/P est environ 10 fois supérieur chez la brebis comparée aux deux autres espèces. Les spécificités de l'efflux médié par PepT2 (tels que l'affinité k_m et la capacité du transport V_m) en fonction de l'espèce pourraient expliquer ces différences observées (Song *et al.*, 2017). De plus, les brebis

produisent un lait deux fois plus riche en protéines (concentration de caséine multipliée par un facteur 1,6 comparé aux vaches et 2 comparé aux chèvres) (Balthazar *et al.*, 2017). Dans l'hypothèse où l'amoxicilline se fixe aux micelles de caséines, elle serait sécrétée davantage dans le lait de brebis. Pour la spiramycine, la $t_{1/2\text{plasma}}$ plus faible chez la chèvre pourrait être expliquée par les différences de métabolisme entre les espèces (Waxman *et al.*, 2001) étant donné que la spiramycine est métabolisée au niveau hépatique (Sanders *et al.*, 1994; Mourier and Brun, 1998).

❖ **Comparaison plasma et lait**

Les $t_{1/2}$ estimées dans le plasma et le lait des différent(e)s espèces/antibiotiques étaient comparables, excepté pour la spiramycine pour laquelle les $t_{1/2}$ estimées dans le lait étaient nettement plus élevées que dans le plasma (18-39 h vs 10-12 h). On peut noter que les concentrations plasmatiques passaient sous la LLOQ plus vite dans le plasma (48h) que dans le lait (168h). On peut donc penser qu'on observe dans le lait une phase d'élimination tardive, sans doute en lien avec un compartiment profond de distribution de la spiramycine. La spiramycine étant lipophile ($\log P$ à 2,5), une forte affinité pour les différents lipides et phospholipides tissulaires est probable. En effet, Ziv *et al* ont montré que la spiramycine (plus de 75% du produit) se fixait aux homogénats de tissus mammaires (Ziv, 1974), ce qui contribuerait à son accumulation dans la glande mammaire et à la phase tardive observée dans le lait.

Pour conclure sur ces résultats préliminaires, la prise en compte d'éventuels transports actifs semble primordiale pour prédire l'excrétion des xénobiotiques dans le lait. Les différences inter-espèces des transports actifs peuvent également avoir leur importance. Le développement ultérieur du modèle PBPK devra donc prendre en compte cet aspect de l'excrétion lactée, notamment en intégrant des résultats *in vitro* de passage actif des molécules. L'accumulation et la fixation potentielle de certaines molécules (lipophiles) dans le tissu mammaire est également un facteur important qui influence le profil cinétique dans le lait. Le modèle PBPK générique développé dans cette thèse prend en compte la fixation aux composants tissulaires pour tenir compte de ce processus. Enfin, les différents antibiotiques choisis dans le projet reflètent un panel de cinétiques différentes dans le plasma et le lait et

permettent d'étudier les différents facteurs influençant le passage de xénobiotiques dans le lait de plusieurs espèces animales.

Troisième partie : Discussion, conclusion et perspectives

6. Discussion générale

Lors de la lactation, différents mécanismes d'excrétion et de transport permettent le transfert des molécules à travers la barrière sang-lait. Bien que ces mécanismes soient connus, peu d'outils permettent de prédire, de manière mécanistique, le passage des différents xénobiotiques dans le lait de diverses espèces en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, de l'anatomie et de la physiologie des espèces, ainsi que de la production et de la composition du lait.

Les travaux de la thèse se sont focalisés sur le passage de quatre antibiotiques aux propriétés distinctes dans le lait de trois espèces animales : la vache, la chèvre et la brebis. Ils ont permis de répondre à plusieurs objectifs qui sont discutés ci-dessous.

❖ Validation d'une méthode de dosage grâce à la méthode globale et quantification des résidus d'un antibiotique et de son métabolite actif dans le lait de trois espèces

La méthode de dosage est une étape primordiale des études de déplétion des résidus, et la validation de cette méthode est un processus clef précédant l'utilisation de la méthode en routine. L'écart entre une concentration mesurée et la vraie concentration peut provenir d'un biais de la méthode (erreur de justesse) ou bien d'une variabilité dans les concentrations mesurées (erreur de fidélité). Une validation selon une approche globale, prenant en compte à la fois la justesse et la fidélité, permet de mieux contrôler le risque associé à l'utilisation de la méthode en routine (Feinberg, 2007; Rozet *et al.*, 2007). Le profil d'exactitude, construit à partir de cette approche, est un outil graphique et statistique qui permet de faciliter la décision de valider (ou non) une méthode analytique, sur un domaine de concentration données. Il permet, à l'aide d'un critère global (unique), l'exactitude, de prendre en compte la justesse et la fidélité sur l'ensemble du domaine de concentrations testées. Cette approche se démarque de l'approche classique (multicritères) qui sépare justesse et fidélité et pour laquelle la décision se fait critère par critère. De plus, l'estimation de l'exactitude est demandée dans les référentiels et par certaines lignes directrices comme celles de la FDA. Cela se traduit en routine par une utilisation de l'exactitude vis à vis de QC, par exemple la FDA exige que 4 QC sur 6 soient compris entre les limites d'acceptabilité (exactitude $\pm 15\%$) (règle des 4/6/15) (Shah *et al.*, 1992), et utiliser l'approche globale permet d'estimer directement cette exactitude.

Au cours de cette thèse, l'utilisation du profil d'exactitude a servi d'une part à caractériser les performances de la méthode (associée à une fonction de réponse unique) et d'autre part à la valider pour le dosage de la spiramycine et de son métabolite actif, la néospiramycine, à la fois dans le lait de vache, de chèvre et de brebis. Les profils d'exactitude individuels, construits pour chacune des matrices, étaient superposés et possédaient la même fonction de réponse. Etant donné qu'aucun effet matrice n'a été observé entre ces profils individuels, un profil d'exactitude unique (CS et VS des trois matrices regroupés) a pu être construit. Avec ce profil d'exactitude unique, il a alors été possible d'utiliser en routine des QC préparés dans une seule des trois matrices, le lait de vache, beaucoup plus facile à se procurer et donc moins cher.

Le dosage en routine a également été simplifié puisque que seuls des QC dans du lait de vache, préparés à l'avance et congelés, ont été extraits en même temps que les échantillons de concentration inconnues. Aucune gamme n'a dû être préparée ni extraite en routine car la fonction de réponse déterminée lors de la validation a servi au dosage des QC et des échantillons de concentrations inconnues. Ceci a simplifié énormément le travail expérimental (en diminuant le nombre d'échantillons à extraire et injecter), ainsi que le traitement des données. La validation des différentes séries de dosage a été faite selon la règle des 4/6/15 à l'aide des QC (Shah *et al.*, 1992).

Lors de la construction du profil d'exactitude, le risque est mieux maîtrisé puisque le pourcentage attendu de mesures qui seront en dehors des limites d'acceptation ($1-\beta$) est fixé. En effet, lors des dosages en routine de la spiramycine et de la néospiramycine, 94,4% des QC (soit 102 QC sur 108) étaient dans les limites d'acceptabilité et aucune série n'a été rejetée, confirmant les prédictions de l'approche.

La construction de l'IT permet également de calculer le rapport (r_j) entre la variance inter-série (fidélité intermédiaire, $\hat{\sigma}_{B,j}^2$) et la variance intra-série (répétabilité, $\hat{\sigma}_{W,j}^2$). Le résultat de ce rapport est un indicateur de la robustesse de la méthode : si le rapport r_j est proche de 0, c'est la répétabilité qui pose problème ; s'il est compris entre 1 et 3, les sources d'erreur sont correctement réparties entre les deux variances ; par contre, s'il est supérieur à 3 (fidélité intermédiaire élevée), c'est la robustesse de la méthode qui est remise en cause.

Un autre terme est à considérer : le nombre de degrés de liberté, ou nombre de mesures efficaces (N_E).

$$N_E = \frac{(r_j + 1)^2}{\frac{(r_j + \frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1 - \frac{1}{n}}{pn}}$$

Celui-ci prend en compte le nombre de séries de validation (p) et le nombre de répétitions par série (n), déterminés *a priori* au début de l'expérience, ainsi que le rapport r_j des variances, estimé à *posteriori* à la fin de l'expérience. Il permet d'estimer, en fonction de la valeur de β (pourcentage de mesures contenues dans le domaine de validité), le **facteur d'élargissement de l'IT**. Ce N_E peut être interprété comme le nombre minimal de mesures à réaliser pour valider une méthode. Il peut ainsi permettre de compléter (en maîtrisant les coûts) la procédure de caractérisation et de validation, en calculant le nombre de mesures qu'il faudrait éventuellement ajouter pour obtenir des intervalles de tolérance plus étroits.

Selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 : 2017, qui concerne tous les laboratoires d'analyses et d'essais (à l'exception des laboratoires d'analyses médicales, NF EN ISO 15189 : 2012), une mesure quantitative doit être rapportée sous forme de valeur unique avec la dispersion possible par rapport à la valeur réelle, c'est-à-dire son incertitude. Celle-ci peut être simplement calculée à partir du profil d'exactitude.

A l'avenir, l'objectif serait d'harmoniser et de faciliter l'utilisation du profil d'exactitude. Par exemple, son intégration dans des logiciels de gestion et de traitement des données analytique (comme Excalibur®) permettrait de calculer directement les concentrations des échantillons inconnus à partir de l'unique fonction de réponse associée au profil d'exactitude et de valider un dosage en routine.

❖ Développement d'un modèle PBPK générique pour prédire l'excrétion dans le lait de plusieurs espèces

➤ Comparaison des méthodes d'estimation de l'excrétion des xénobiotiques dans le lait

Nous avons vu dans l'introduction de cette thèse (voir section 1.4.3.4) que différents auteurs avaient publié des formules mathématiques, obtenues à partir d'analyses multivariées, pour estimer l'excrétion des xénobiotiques dans le lait (Rasmussen, 1971; Meskin and Lien, 1985; Atkinson and Begg, 1988, 1990; Koshimichi *et al.*, 2011). Après avoir généré des données expérimentales d'excrétion de l'amoxicilline, la marbofloxacin, l'oxytétracycline et la spiramycine dans le lait de vache, nous avons souhaité comparer les performances prédictives

de ces méthodes ainsi que celles de notre modèle PBPK (appliqué à l'oxytétracycline) avec la NCA qui fait office de référence. Les résultats, présentés Tableau 7, sont très disparates.

Tableau 7 : Résultats des calculs des ratios M/P des quatre antibiotiques de ce travail à partir de différents modèles *in silico*.

Méthode	Paramètre	Amoxicilline	Marbofloxacin	Oxytétracycline	Spiramycine
NCA (référence)	M/P	$1 * 10^{-5}$	0,9	0,7	43
Rasmussen 1971	M_u/P_u	0,19	0,20	0,52	5,20
Atkinson 1988	M_{skin}/P	0,16	0,14	0,44	4,12
Atkinson 1990	M/P	0,02	$2,15 * 10^{-7}$	0,19	34,71
Meskin 1985	M/P	0,25	0,12	0,27	1,67
Koshimichi 2011	M/P	1,32	3,29	6,76	0,68
PBPK	M/P	NA	NA	0,71	NA
	M_u/P_u			0,37	

Note : NCA ; Analyse non compartimentale des données expérimentales ; NA : non disponible.

La première méthode, publiée par Rasmussen *et al.* (Rasmussen, 1971), ne prend en compte que l'ionisation dans le plasma et le lait. On note que, pour les 4 molécules étudiées, cette méthode permet de déterminer correctement si les concentrations dans le lait sont supérieures ou inférieures aux concentrations dans le plasma, mais que les valeurs absolues des rapports M/P estimés sont assez éloignées des valeurs expérimentales (calculées avec la NCA).

La méthode publiée par Atkinson *et al.* (Atkinson and Begg, 1988) prend également en compte l'ionisation mais aussi la fraction libre dans le lait écrémé. Celle-ci étant estimée à 0,96 pour toutes les molécules, les résultats sont proches de ceux de Rasmussen *et al.* Plus tard, Atkinson *et al.* (Atkinson and Begg, 1990) ont complété leur formule pour prendre en compte la diffusion dans les lipides du lait. D'après les résultats (Tableau 7), cette nouvelle formule a permis d'améliorer l'estimation du rapport M/P pour la spiramycine, qui est la molécule la plus lipophile ($\log D_{7,2}=0,37$), mais pour les 3 autres molécules (qui ont des $\log D_{7,2}<0$) les estimations ne sont pas meilleures.

Meskin *et al.* (Meskin and Lien, 1985) ont publié une formule prenant en compte le PM des molécules, qui réduit la perméabilité et l'affinité pour les graisses mais ne considérant

l'ionisation que pour les bases (spiramycine) et pas pour les acides (les trois autres molécules). Cette méthode prédit moins bien le ratio M/P de la spiramycine, probablement dû au fait que le logP est négativement corrélé avec l'excrétion dans le lait dans leur formule, contrairement à la formule de Atkinson *et al.*

La formule de Koshimichi *et al.* (Koshimichi *et al.*, 2011) prédit des clairances de sécrétion (notamment actives) dans le lait, et de réabsorption dans le plasma à partir de la PSA, des HBD, du logP et du PM des molécules. On peut noter que cette formule ne permet pas une estimation correcte des ratios M/P. La prédiction est notamment mauvaise pour la spiramycine, peut-être également à cause du logP qui est négativement corrélé avec l'excrétion lactée dans la formule. L'estimation de la fraction libre dans le lait n'est également pas correctement estimée puisqu'elle est de 0,99 pour la spiramycine et de 1,00 pour les autres molécules avec la formule de Koshimichi *et al.*

Pour conclure, ces différentes tentatives de prédiction de l'excrétion dans le lait ont été assez peu concluantes. La prise en compte de l'ionisation et de la lipophilie des molécules semble importante mais insuffisante et la considération d'autres facteurs comme le PM, la PSA ou les HBD n'ont pas amélioré les prédictions. La prise en compte de l'affinité pour la MG n'est également pas suffisante pour estimer correctement la fraction libre dans le lait.

Le modèle PBPK que nous avons développé et appliqué à l'oxytétracycline, considérant à la fois l'ionisation, l'affinité pour les différents constituants du lait (gras, caséine, protéines du lactosérum, cations) mais aussi de la mamelle (lipides et phospholipides), la perméabilité mammaire et la dynamique de traite, a permis d'obtenir une estimation du ratio M/P pour l'oxytétracycline cohérente avec celle obtenue par NCA. Ce modèle sera néanmoins à adapter pour les autres molécules.

➤ Perspectives d'évolution du modèle PBPK

L'objectif final de ce modèle PBPK est son utilisation générique pour prédire l'excrétion lactée d'autres molécules dans le lait d'autres espèces animales (ex : brebis), voire dans le lait de la femme. Pour cela, nous avons développé un modèle PBPK assez mécanistique.

Celui-ci utilise les équations de Rodgers et Rowland (Rodgers, Leahy and Rowland, 2005; Rodgers and Rowland, 2006) pour calculer le ratio sang-plasma (BP), l'état d'ionisation des molécules dans les différents milieux, les affinités pour certains composants (albumine EW, NP et NL) et les fractions libres ($f_{u_{IW}}$, $f_{u_{EW}}$, f_{u_m}). Cependant, il a été montré que pour les

molécules très ionisées ($|\text{pH}-\text{pKa}|>2$), le modèle de Schmitt (Schmitt, 2008) est plus prédictif concernant les coefficients de partage tissu-sang (Utsey *et al.*, 2020). Schmitt détaille la fixation des molécules chargées positivement aux phospholipides acides ainsi que la répulsion des molécules chargées négativement, ce qui modifie le coefficient de partage. Pour appliquer notre modèle PBPK aux trois autres antibiotiques, chacun étant fortement ionisé avec à la fois des charges positives et négatives, il serait intéressant d'implémenter la méthode de Schmitt dans le modèle. De plus, Schmitt *et al* ont récemment amélioré le modèle de Rodgers *et al* en estimant la séquestration des molécules basiques dans les lysosomes, influençant ainsi leur distribution intracellulaire (Schmitt *et al.*, 2020) ; cette hypothèse serait donc également à tester pour des molécules basiques telles que la spiramycine.

Il est à noter qu'aucun transport actif n'a été considéré dans le modèle puisque que l'oxytétracycline n'est pas connue pour être substrat de transporteurs sur-exprimés (et au rôle bien connu) au niveau de la mamelle pendant la lactation. Cependant pour les 3 autres molécules la prise en compte de possibles transports actifs (BCRP et PepT2, surexprimés pendant la lactation) semble importante, et pour intégrer cette information dans les modèles, l'utilisation d'outils *in vitro* et/ou *in silico* est à développer. Des expérimentations *in vitro* sont prévues en collaboration avec les universités d'Utrecht et de Leipzig (des résultats préliminaires ont été rapportés section 5.3) afin d'estimer l'affinité des molécules pour ces transporteurs.

Les affinités pour les composants du lait et du tissu mammaire vont également être adaptées aux molécules. Par exemple, la fixation de la marbofloxacin aux cations (calcium et magnésium) sera considérée. D'autres propriétés, comme la métabolisation de la spiramycine en néospiramycine, pourront également être explorées.

Au niveau de la physiologie, le modèle pourrait être amélioré en considérant la variation au cours du temps et des stades de lactation du pH, de la MG et des protéines (% caséines et % protéines du lactosérum) ainsi que du volume de lait produit (Linn, 1988; Ozdemir *et al.*, 2018).

➤ Application du modèle PBPK au TA et limites

Les modèles PBPK sont des outils pertinents pour prédire le transfert de molécules dans le lait et répondre à l'enjeu de sécurité sanitaire des aliments. Ils peuvent également prédire des TA, notamment pour les espèces mineures pour lesquelles les TA sont extrapolés à partir de données observées chez les espèces majeures (TA forfaitaires). Par exemple, l'OTC peut être utilisée hors AMM chez les moutons et les chèvres et le manque d'un TA adéquate dans ces

espèces peut entraîner des résidus au-dessus de la LMR, même en respectant le TA forfaitaire (Riad *et al.*, 2021).

Le modèle PBPK générique développé dans cette thèse a permis d'estimer un TA chez les deux espèces, proche des TA réglementaires (3 jours vs 4 jours pour les vaches ; 4 jours vs 4 jours pour les chèvres, le TA réglementaire étant extrapolé à celui des vaches). L'estimation de ce TA dépend beaucoup de l'IIV et de l'incertitude prises en compte dans le modèle. Bien que ces deux facteurs aient été fixés à partir de données de la littérature pour la majorité des paramètres, le CV a été fixé à 30% et 20% pour quelques paramètres physiologiques et physico-chimiques pour lesquels les données n'étaient pas disponibles. Ces CV fixés empiriquement sont majoritairement utilisés dans la communauté scientifique, cependant ils peuvent influencer grandement l'intervalle de prédiction (IP) et ainsi l'estimation du TA. Afin de faire progresser les outils PBPK dans la prédiction de TA, il serait nécessaire d'harmoniser les règles de construction de l'IP autour des différents paramètres du modèle.

7. Conclusion

Les travaux de thèse ont permis de développer un modèle PBPK pour décrire le passage de xénobiotiques dans le lait de différentes espèces animales. Le modèle a été validé pour décrire et prédire l'excrétion lactée de l'oxytétracycline dans le lait de vache et de chèvre. Par la suite, ce modèle sera appliqué aux trois autres antibiotiques présentés dans ces travaux de thèse, en prenant en compte des transporteurs actifs grâce à des expérimentations *in vitro* réalisées en collaboration avec les Universités de Utrecht et Leipzig. Il sera également appliqué pour prédire le passage de deux molécules dans le lait de brebis, grâce aux expérimentations *in vivo* réalisées au début de cette thèse. *In fine*, ce modèle pourrait avoir comme intérêt de prédire les TA des espèces telles que les chèvres et les brebis pour lesquelles les TA sont majoritairement forfaitaires.

Actuellement la modélisation PBPK ne se substitue pas aux études de déplétion des résidus *in vivo*, cependant elle peut être utilisée comme **outil de décision** permettant de simuler le passage de xénobiotiques dans le lait (Anderson and Sauberan, 2016) et de mieux estimer le ratio M/P des molécules, en considérant les différents aspects mécanistiques qui sont souvent sous-estimés dans les modèles simplifiés (échange sang-lait, production de lait, fixation aux composants du lait). Le potentiel ultime (avancée majeure) du PBPK serait que les données *in vivo* ne soient plus nécessaires pour prédire le passage d'une molécule dans le lait. Pour cela il faudrait disposer de données physiologiques précises pour chaque espèce (surtout les chèvres, pour lesquelles on manque de données), des connaissances *in vitro* sur les interactions de chaque molécule avec les composants du lait et la mise en place de facteurs d'extrapolation *in vitro-in vivo* pour utiliser directement les données mesurées *in vitro* dans un modèle (par exemple le rapport de surface *in vitro-in vivo* à travers lequel la diffusion passive se produit).

En attendant, les modèles PBPK doivent faire l'objet d'un consensus sur les critères à utiliser pour l'acceptation des modèles (Nauwelaerts *et al.*, 2021).

8. Annexes

Supplementary Materials

A Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Model to Explore the Blood-Milk Barrier in Lactating Species: Case Study with Oxytetracycline Administered to Dairy Cow and Goat

Jennifer Tardiveau^{1,2}, Lerica LeRoux-Pullen³, Ronette Gehring³, Gaël Touchais⁴, Marie Pierre Chotard-Soutif⁴, Hélène Mirfendereski^{1,5}, Carine Paraud⁶,
Matthieu Jacobs^{7#}, Reynald Magnier⁷, Michel Laurentie⁴, William Couet^{1,2,5}, Sandrine Marchand^{1,2,5}, Alexis Viel^{4\$}, Nicolas Grégoire^{1,2,5\$*}

^{\$}These authors contributed equally

¹INSERM U1070, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France

²Université de Poitiers, UFR de Médecine Pharmacie, 6 rue de la Milétrie 86073 Poitiers Cedex, France

³Department of Population Health Sciences: IRAS Veterinary and Comparative Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 104, 3508 TD Utrecht, The Netherlands

⁴ANSES, Laboratoire de Fougères, 10B rue Claude Bourgelat, Bioagropolis, Javené 35306 Fougères, France

⁵CHU de Poitiers, département de toxicologie et pharmacocinétique, 2 rue de la Milétrie 86073 Poitiers Cedex, France

⁶ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, site de Niort, 60 rue de Pied de Fond 79024, Niort, France

⁷Ceva Santé Animale, Libourne I&D Center, 10 Avenue de la Ballastière, 33500 Libourne, France

[#]Present address: Servier, Quantitative Pharmacology department, 25 rue Eugène Vignat, 45000 Orléans, France

^{*}To whom correspondence should be addressed: nicolas.gregoire@univ-poitiers.fr ; Address: 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France.

Contents

1.	Index of Tables and Figures	214
2.	Material and methods	216
2.1.	Animals	216
2.1.1.	Demographic characteristics of the animals from the current study	216
2.2.	Global PBPK Model Structure	216
2.2.1.	PBPK typical values for cows and goats	216
2.2.2.	Blood to plasma ratio calculation	218
2.2.3.	Tissue to plasma partition coefficients determination	219
2.3.	Udder and Milk Model	220
2.3.1.	Surface area calculation	220
2.3.2.	Udder and milk model	221
2.4.	Establishment of the popPBPK Model	232
2.4.1.	Parameters distribution	232
3.	Results	236
3.1.	Model Calibration	236

3.1.1. Estimation of intramuscular absorption rate	-----236
3.2. Model Evaluation : Validation and Sensitivity Analysis	-----239
3.2.1. External validation of the PBPK model	-----239
3.3. Partition coefficient simulations	-----242
3.3.1. Partition coefficient (k_{tissue}) calculation based on Rodger and Rowland's equations	-----242
4. PBPK Model Code	-----244
5. Supplementary References	-----254

1. Index of Tables and Figures

Tables

Table S1 : Cow and Goat demographic characteristics.....	216
Table S2 : Tissue and organ volume and blood flow used in the PBPK Model. One value per row means that the same value was used for both species. The parameters identified by an asterisk were evaluated in the global sensitivity analysis.....	217
Table S3: Distributions of Parameters Used in Monte Carlo simulations for the PBPK Model of OTC in Cow. All parameters were assumed to follow a log-normal distribution	232
Table S4:Distributions of Parameters Used in Monte Carlo simulations for the PBPK Model of OTC in Goat. All parameters were assumed to follow a log-normal distribution	234
Table S5: k_{IM} estimation from experimental data	236
Table S6: Partition coefficient (k_{tissue}) based on literature or on Rodger and Rowland's equations.....	242

Figures

Figure S1: Cow (A) Individual fits of plasma concentrations after model calibration, with k_{IM} estimation (B) Observations versus predictions plot	237
Figure S2: Goat (A) Individual fits of plasma concentrations after model calibration, with k_{IM} estimation (B) Observations versus predictions plot	238
	214

Figure S3: External validation with observed data of OTC in plasma (A) and milk (B) of cow after an IV of 5 mg/kg (Nouws et al., 1985a). ...	239
Figure S4: External validation with observed data of OTC in cow milk after IM of 10 mg/kg/day for 5 days (A) after an IV of 10 mg/kg (B) after an IV of 10 mg/kg followed by IM of 10 mg/kg/day for 4 days (C) (unpublished data).	240
Figure S5: External validation with observed data of OTC in plasma (left panels) and milk (right panels) of goat after an IM (top panel) or IV (bottom panel) of 20 mg/kg (Rule et al., 2001).....	241
Figure S6: Influence of the partition coefficient (K_{tissue}) values on the pharmacokinetics of OTC in cow plasma (A) and milk (B). K_{tissue} were from <i>in vivo</i> data or estimated from Rogers and Rowland's equations (Rodgers et al., 2005).....	243

2. Material and methods

2.1. Animals

2.1.1. Demographic characteristics of the animals from the current study

Table S1 : Cow and Goat demographic characteristics.

	Cow (n=6)			Goat (n=6)		
	Min	Median	Max	Min	Median	Max
V_{milk} (IMI of 8h) (L)	3	6	8	0.56	1.05	1.48
V_{milk} (IMI of 16h) (L)	5	11	13	0.80	1.48	2.35
BW (kg)	500	575	610	61	63	78
TB (%)	39	50	53	29	35	38
TP (%)	35	36	37	29	33	36

V_{milk}: the volume of milk produced at each milking; IMI: inter-milking interval; BW: body weight; TB: butyrous rate; TP : proteus rate.

2.2. Global PBPK Model Structure

2.2.1. PBPK typical values for cows and goats

Table S2 : Tissue and organ volume and blood flow used in the PBPK Model. One value per row means that the same value was used for both species. The parameters identified by an asterisk were evaluated in the global sensitivity analysis.

Parameter	Compartment	Abbreviations	Cow	Goat
Cardiac output (L/h/kg) *		CO	5.45 ¹	8.17 ²
Body weight (kg)		BW	individual data from the current study	
Haematocrit (%) *		hmtc	0.35 ³	0.30 ³
Non-fat organ density (kg/L)		d _{nonfat}	1.06 ⁴	
Adipose density (kg/L)		d _{fat}	0.9 ⁴	
Blood flow (% CO)	Muscle *	BF _{muscle}	18 ⁵	22 ⁵
	Kidneys *	BF _{kidneys}	7 ¹	16.73 ⁴
	Liver *	BF _{liver}	51 ^a	33 ⁵
	Adipose tissue *	BF _{fat}	7.4 ^b	8.33 ⁴
	Udder *	BF _{udder}	13 ¹	8 ⁶
	Lumping compartment	BF _{rest}	3.6 ^c	11.94 ^c
Relative weight (% BW)	Blood *	f _{blood}	4.52 ^{1,d}	5.49 ^{2,d}
	Lung *	f _{lung}	0.7 ¹	1.22 ²
	Muscle *	f _{muscle}	36.10 ¹	38.58 ²
	Kidneys *	f _{kidneys}	0.25 ¹	0.38 ²
	Liver *	f _{liver}	1.31 ¹	1.89 ²
	Adipose *	f _{fat}	13.21 ¹	9.14 ²
	Udder *	f _{udder}	3.20 ¹	1.78 ²
	Lumping	f _{rest}	40.72 ^c	41.52 ^c
Relative weight of lumping organs and tissues (% BW)	Density (kg/L)	d _{rest}	1	
	Gastro-intestinal * (reticulum, rumen, omasum, abomasum)	f _{GItract}	2.16 ¹	2.787 ⁷
	Intestines *	f _{intestines}	1.37 ¹	5.4 ⁸
	Bones *	f _{bones}	8.66 ¹	NA
	Carcass *	f _{carcass}	NA	9.8 ⁸
	Brain *	f _{brain}	0.07 ¹	0.2 ⁸
	Heart *	f _{heart}	0.37 ¹	0.4 ⁸
	Pancreas *	f _{pancreas}	0.08 ¹	0.09 ⁹

	Spleen *	f_{spleen}	0.16 ¹	0.11 ¹⁰
	Rest of lumping compartment	$f_{\text{restofrest}}$	27.85 ^e	22.73 ^e
Blood cells composition	Blood cells intracellular water fraction *	$f_{\text{IW,BC}}$	0.603 ¹¹	
	Blood cells neutral lipid fraction *	$f_{\text{NL,BC}}$	0.0017 ¹¹	
	Blood cells neutral phospholipid fraction *	$f_{\text{NP,BC}}$	0.0029 ¹¹	
Plasma composition	Plasma neutral phospholipid fraction *	$f_{\text{NP,p}}$	0.0013 ¹¹	
	Plasma neutral lipid fraction *	$f_{\text{NL,p}}$	0.0023 ¹¹	
Muscle composition	Muscle extracellular water fraction *	$f_{\text{EW,muscle}}$	0.1180 ¹¹	
	Muscle intracellular water fraction *	$f_{\text{IW,muscle}}$	0.6300 ¹¹	
	Muscle neutral lipid fraction *	$f_{\text{NL,muscle}}$	0.01 ¹¹	
	Muscle neutral phospholipid (mg/g) *	$f_{\text{NP,muscle}}$	0.0072 ¹¹	

^a This value is the average of 58% (Lin et al., 2020) and 44% (Lin et al., 2016); ^b This value is the average of 6.8% (Lautz et al., 2020) and 8% (Li et al., 2018); ^c Lumping compartment blood flow or volume were 100% minus the sum of other organs blood flow (except blood and lung) or volume; ^d According to (Brown et al., 1997), a 25:75 division of blood volume (4.52% for cow, 5.49% for goat) between arterial and venous circulations was considered; ^e The value corresponds to the difference between the volume of rest (frest) and the sum of the volume of gastro-intestinal, intestines, bones, carcass, brain, heart, pancreas and spleen.

Sources:¹(Lin et al., 2020); ²(Li et al., 2020); ³(Jackson and Cockcroft, 2002); ⁴(Upton, 2008); ⁵(Lin et al., 2016); ⁶(Maltz et al., 1984); ⁷(Ji et al., 2017); ⁸(Lautz et al., 2020); ⁹(Williams et al., 2007); ¹⁰(McCutcheon et al., 1993); ¹¹(Rodgers et al., 2005)

2.2.2. Blood to plasma ratio calculation

Blood to plasma ratio (BP) represented drug binding and distribution to erythrocytes relative to plasma. It depended on erythrocytes to plasma ratio (EP) and haematocrit (Htmc) (cf Table S2) (Eq. S1 and S2):

$$BP = (EP - 1) \times Htmc + 1 \quad (S1)$$

$$\text{where} \quad (S2)$$

$$EP = Ku_{BC} \times fu_p$$

with Ku_{BC} was the unbound partition coefficient in blood cells and fu_p the unbound fraction in plasma (cf Table 1 in the main text).

Ku_{BC} depended on the class of the molecule: bases and zwitterions of group 1 that had at least one basic $pka \geq 7$ or acids and zwitterions of group 2 that had none basic $pka \geq 7$ (*i.e.* OTC) (Rodgers et al., 2005). It was calculated based on the Rodger and Rowland equations (Rodgers et al., 2005; Rodgers and Rowland, 2006) according to the Eq. S3 for zwitterions of group 1 and Eq. S4 for zwitterions of group 2:

$$Ku_{BC} = \frac{V}{W} \times f_{IW,BC} + \frac{ka_{AP,BC} \times AP_{BC} \times (V - 1)}{W} + \frac{P \times f_{NL,BC} + (0.3P + 0.7) \times f_{NP,BC}}{W} \quad (S3)$$

$$Ku_{BC} = \frac{V}{W} \times f_{IW,BC} + \frac{P \times f_{NL,BC} + (0.3P + 0.7) \times f_{NP,BC}}{W} \quad (S4)$$

where terms were defined in Table S2.

With the ionization ratio in blood cell and plasma, respectively V and W, and the lipophilicity (P) were estimated as following (Eq.s S5 and S6):

$$V = 1 + 10^{pKa_{Base}-pH_{BC}} + 10^{pH_{BC}-pKa_{Acid}} \quad (S5)$$

$$W = 1 + 10^{pKa_{Base}-pH_P} + 10^{pH_P-pKa_{Acid}} \quad (S6)$$

Where $P = 10^{\log P}$ and pH_{BC} and pH_P were 7.22 and 7.40, respectively (cf Table 1 in the main text) (Rodgers et al., 2005).

2.2.3. Tissue to plasma partition coefficients determination

Values of tissue to plasma partition coefficients (k_{tissue}) of each tissue were obtained in sheep from Craigmill's paper (Craigmill, 2003), except for the k_{lung} obtained in cow from Achenbach's paper (Achenbach, 1998) (see Table 1 in the main text). Considering the adequate f_{up} (0.79 for sheep and 0.81 for cow) and Eq. S7, we estimated the unbound partition coefficients ($k_{u\text{tissue}}$) for each tissue. We made the hypothesis that these $k_{u\text{tissue}}$ could be applied to the cow and the goat, and from the f_{up} values specific to these 2 species we estimated the corresponding k_{tissue} (Eq. S7) (see Table 1 in the main text).

$$Ku_{\text{muscle}} = \frac{K_{\text{muscle}}}{f_{up}} \quad (S7)$$

2.3.Udder and Milk Model

2.3.1. Surface area calculation

Surface area (SA) was used to convert apparent permeability (Papp) (cf Table 1 in the main text) from *in vitro* experiments, to passive milk clearance (CL_{diff}). It was not found in the literature for udder ruminant therefore it was calculated based on geometric approach (Ng and Hungerbühler, 2013). Assuming a cylindrical geometry of a single capillary, total capillary surface area (SA) and volume (Volume) of a capillary could be calculated based on the following equations:

$$SA = 2 \pi r L$$

$$\text{Volume} = \pi r^2 L$$

where n, r and L are the capillaries number, radius (mm) and length (mm), respectively.

As the fraction of blood volume (f_{vasc}) in the tissue is known and assuming that 98% of total udder blood is distributed to lobulo-alveolar tissue (Thompson, 1980), calculation of total capillary surface area and volume were simplified as (Eq.s S8 and S9) :

$$SA = \frac{2 \times Volume}{r} \quad (S8)$$

$$Volume = 0.98 \times f_{\text{vasc}} \times V_{\text{udder}} \quad (S9)$$

where f_{vasc} (cf Table 1 in the main text) was the fractional volume of udder corresponding to vascular space and V_{udder} (cf Table S2 for the fraction of body weight to udder and the density) was the udder volume (mm^3).

Capillary radius (r) (cf Table 1 in the main text) was found in the literature (Prosser, 1996). SA was then converted to cm^2/g of tissue by dividing by udder weight (cf Table S2).

2.3.2. Udder and milk model

2.3.2.1. *Extracellular water*

❖ **Ionization**

The total unbound concentration (Cu) is the sum of ionized (ion) and unionized (union) unbound species in tissue as extracellular water (EW) as in vascular space (p):

$$Cu_{EW} = Cu_{union,EW} \times Y \quad (S10)$$

$$Cu_P = Cu_{union,P} \times W \quad (S11)$$

where Y is the ionization ratio in extracellular water (EW), calculated for zwitterions of both groups as:

$$Y = 1 + 10^{pKa_{Base}-pH_{EW}} + 10^{pH_{EW}-pKa_{Acid}} \quad (S12)$$

and W is detailed in Eq. S6.

Hence,

$$Cu_{union,EW} = \frac{Cu_{EW}}{Y} \quad (S13)$$

$$Cu_{ion,EW} = Cu_{EW} \times \frac{(Y-1)}{Y} \quad (S14)$$

When the unbound unionized species are in equilibrium in the vascular and EW:

$$Cu_{union,EW} = Cu_{union,P} \quad (S15)$$

$$Cu_{EW} = Cu_P \times \frac{Y}{W} \quad (S16)$$

As pH in EW and plasma were both equal to 7.4, thus W=Y and:

$$Cu_{EW} = Cu_P \quad (S17)$$

❖ Binding

In the extracellular space, OTC was supposed to bind to albumin (alb) (Chi et al., 2010). Assuming that non-saturation conditions prevailed, association constant of OTC with albumin (ka_{alb}) was defined as:

$$ka_{alb} = \frac{Cb_{alb,EW}}{alb_{EW} \times Cu_{EW}} \quad (S18)$$

where $Cb_{alb,EW}$ was the concentration of OTC bound to albumin in EW and alb_{EW} was the concentration of albumin in EW.

According to this relation:

$$Cb_{alb,EW} = ka_{alb} \times alb_{EW} \times Cu_{EW} \quad (S19)$$

Combining with eq. S17:

$$Cb_{alb,EW} = ka_{alb} \times alb_{EW} \times Cu_P \quad (S20)$$

Assuming that albumin present in the udder was only localized in EW, albumin concentration in EW of udder was found in the literature (Vestweber and Al-Ani, 1984) (cf Table 1 in the main text).

Since the pH was identical in plasma and in EW (pH=7.4) (cf Table 1 in the main text), ka_{alb} was estimated from the unbound fraction in plasma (Eq. 23):

$$fu_p = \frac{Cu_p}{C_p} = \frac{Cu_p}{Cu_p + Cb_p} \quad (S21)$$

Where Cb_p was the concentration in plasma bound to neutral lipids (NL,P), neutral phospholipids (NP,P) and to albumin (alb,P) present in plasma, according to eq. 12 of Rodgers and al (Rodgers and Rowland, 2006):

$$fu_p = \frac{1}{1 + \left(\left(\frac{P \times f_{NL,P} + (0.3 \times P + 0.7) \times f_{NP,P}}{W} \right) + ka_{alb} \times alb_p \right)} \quad (S22)$$

$f_{NL,P}$, $f_{NP,P}$ and alb_p were the fraction of neutral lipid, the fraction of neutral phospholipids and the concentration of albumin in plasma respectively (cf Table S2). Plasma albumin concentrations were 30.80 and 31.80 g/L for cows and goats and were from the literature (Bobbo et al., 2017), (Alberghina et al., 2010) (cf Table 1 in the main text).

Hence, according to eq. 13 of Rodgers and al (Rodgers and Rowland, 2006):

$$ka_{alb} = \left(\frac{1}{fu_p} - 1 - \left(\frac{P \times f_{NL,P} + (0.3 \times P + 0.7) \times f_{NP,P}}{W} \right) \right) \times \frac{1}{alb_p} \quad (S23)$$

❖ Free concentration

The total concentration of OTC in extracellular water was:

$$C_{EW} = Cu_{EW} + Cb_{alb,EW} = Cu_p \times (1 + ka_{alb} \times alb_{EW}) \quad (S24)$$

Hence, unbound fraction of OTC in the EW became:

$$fu_{EW} = \frac{Cu_{EW}}{C_{EW}} = \frac{1}{(1 + ka_{alb} \times alb_{EW})} \quad (S25)$$

To use one differential equation to determine OTC udder concentrations in vascular space and extracellular water, a ratio between the total EW concentration and the total blood concentration in the vascular space ($K_{EW/B}$) was used (Jamei et al., 2014).

The total blood concentration (C_B) of OTC in the vascular space was:

$$C_B = C_P \times BP = \frac{Cu_p}{fu_p} \times BP \quad (S26)$$

According to equation 15 of Jamei and al (Jamei et al., 2014), the ratio $K_{EW/B}$ was:

$$K_{\frac{EW}{B}} = \frac{C_{EW}}{C_B} = \frac{(1+ka_{alb} \times [alb]_{EW})}{BP/fu_p} \quad (S27)$$

2.3.2.2. Intracellular water

❖ Ionization

The total unbound concentration in intracellular water (Cu_{IW}):

$$Cu_{IW} = Cu_{union, IW} \times X \quad (S28)$$

with the ionization ratio in intracellular water, X, calculated as followed (Eq. S29):

$$X = 1 + 10^{pKa_{Base} - pH_{IW}} + 10^{pH_{IW} - pKa_{Acid}} \quad (S29)$$

Hence,

$$Cu_{union,IW} = \frac{Cu_{IW}}{X} \quad (S30)$$

$$Cu_{ion,IW} = Cu_{IW} \times \frac{(X-1)}{X} \quad (S31)$$

where X is detailed in the Eq. S7.

❖ Binding

Partition of unbound and unionized OTC in the intracellular water occurred between the neutral lipids, neutral phospholipids and with milk components that are also present in the secretory epithelial cells (CES) such as fat, casein, whey proteins, calcium and magnesium.

- Affinity for neutral lipids (NL)

The affinity for unionized form of OTC for NL depended on the octanol/water partition coefficient (P) (cf Table 1 in the main text).

$$Cb_{NL,IW} = P \times Cu_{union,IW} \quad (S32)$$

By considering eq. S30:

$$Cb_{NL,IW} = P \times \frac{Cu_{IW}}{X} \quad (S33)$$

- Affinity for neutral phospholipids (NP)

NP was constituted of 30% neutral lipid and 70% of water (Rodgers et al., 2005). Thus, the concentration of unionized drug in NP was:

$$Cb_{NP,IW} = 0.3 \times P \times Cu_{union,IW} + 0.7 \times Cu_{union,IW} \quad (S34)$$

$$Cb_{NP,IW} = 0.3 \times P \times \frac{Cu_{IW}}{X} + 0.7 \times \frac{Cu_{IW}}{X} \quad (S35)$$

- Affinity for milk components

Association of OTC with milk components present in CES were defined as:

$$Cb_{fat} = ka_{fat,IW} \times Fat_{IW} \times Cu_{IW} \quad (S40)$$

$$Cb_{casein} = ka_{casein,IW} \times Casein_{IW} \times Cu_{IW} \quad (S41)$$

$$Cb_{whey} = ka_{whey} \times PR_{whey,IW} \times Cu_{IW} \quad (S42)$$

$$Cb_{calcium} = ka_{calcium,IW} \times Calcium_{IW} \times Cu_{IW} \quad (S43)$$

$$Cb_{magnesium} = ka_{magnesium,IW} \times Magnesium_{IW} \times Cu_{IW} \quad (S44)$$

Intracellular water concentrations of fat, casein and whey protein were assumed to be equal to those in milk (see 2.3.2.3). Intracellular water concentrations of free magnesium and free calcium were 0.024 g.L⁻¹ (Martens and Stumpff, 2019) and 0.0114 g.L⁻¹ (Neville and Watters, 1983), respectively (see Table 1 in the main text).

Association constant of OTC to **fat** and **casein** were estimated from their logD values in IW according to results of Shappell, Lupton and al (Shappell et al., 2017) (Lupton et al., 2018):

$$ka_{fat,IW} = 10^{0.49 \times \log(D_{IW}) - 3.112} \quad (S45)$$

$$ka_{casein,IW} = 10^{0.29 \times \log(D_{IW}) - 2.09} \quad (S46)$$

with $\log(D_{IW}) = \log(P) - \log(X)$ (Shappell et al., 2017)

Association constant to **calcium** and **magnesium** was obtained in the literature (Carlotti et al., 2012), (Martin, 1979).

$$ka_{magnesium,IW} = \frac{10^{0.7085 \times pH_{IW} - 2.0478}}{MW_{magnesium}} \quad (S47)$$

$$ka_{calcium,IW} = \frac{10^{0.7085 \times pH_{IW} - 2.0478}}{MW_{calcium}} \quad (S48)$$

Association constant of **whhey proteins** was assumed to be the same that in milk (see 2.3.2.3).

❖ Free fraction

The concentration of the unbound and bound OTC in the intracellular water was defined based on eq 20 of Jamei and al (Jamei et al., 2014):

$$C_{IW} = \frac{Cu_{IW} \times f_{IW} + Cb_{NL,IW} \times f_{NL} + Cb_{NP,IW} \times f_{NP}}{f_{IW}} + Cb_{fat} \times Fat_{IW} + Cb_{casein} \times Casein_{IW} + Cb_{wheyprot} \times Wheyprot_{IW} + Cb_{calcium} \times Calcium_{IW} + Cb_{magnesium} \times Magnesium_{IW} \quad (S49)$$

where f_{IW} , f_{NL} and f_{NP} are the fraction of intracellular water, neutral lipids and neutral phospholipids in udder, respectively.

$$C_{IW} = \frac{Cu_{IW} \times f_{IW} + P \times \frac{Cu_{IW}}{X} \times f_{NL} + \left(0.3 \times P \times \frac{Cu_{IW}}{X} + 0.7 \times \frac{Cu_{IW}}{X}\right) \times f_{NP}}{f_{IW}} \quad (S50)$$

$$+ ka_{fat,IW} \times Fat_{IW} \times Cu_{IW} + ka_{casein,IW} \times Casein_{IW} \times Cu_{IW} + ka_{wheyprot} \times Wheyprot_{IW} \times Cu_{IW} + ka_{calcium,IW} \times Calcium_{IW} \times Cu_{IW}$$

$$+ ka_{magnesium,IW} \times Magnesium_{IW} \times Cu_{IW}$$

Putting all these together we obtained f_{uIW} as:

$$fu_{IW} = \frac{Cu_{IW}}{C_{IW}} \quad (S51)$$

$$= \frac{1}{\frac{1}{f_{IW}} \times \left(f_{IW} + \frac{P \times f_{NL} + (0.3 \times P + 0.7) \times f_{NP}}{X} \right) + ka_{fat,IW} \times Fat_{IW} + ka_{casein,IW} \times Casein_{IW} + ka_{wheyprot} \times Wheyprot_{IW} + ka_{calcium,IW} \times Calcium_{IW} + ka_{magnesium,IW} \times Magnesium_{IW}}$$

2.3.2.3. Milk

❖ Ionization

The total unbound concentration in milk (Cu_{milk}):

$$Cu_{milk} = Cu_{union,milk} \times Z \quad (S52)$$

Hence,

$$Cu_{union,milk} = \frac{Cu_{milk}}{Z} \quad (S53)$$

$$Cu_{ion,milk} = Cu_{milk} \times \frac{(Z-1)}{Z} \quad (S54)$$

where Z is the ionization ratio in milk, calculated as:

$$Z = 1 + 10^{pKa_{Base} - pH_{milk}} + 10^{pH_{milk} - pKa_{Acid}} \quad (S55)$$

❖ Binding

In milk as in intracellular water, OTC was distributed in fat, casein, whey proteins and major metal ions.

- Affinity for fat, casein and whey proteins in milk

Affinity for fat, casein and whey proteins in milk was defined as:

$$Cb_{fat} = ka_{fat,MILK} \times Fat_{MILK} \times Cu_{milk} \quad (S56)$$

$$Cb_{casein} = ka_{casein,MILK} \times Casein_{MILK} \times Cu_{milk} \quad (S57)$$

$$Cb_{whey} = ka_{whey} \times PR_{whey,MILK} \times Cu_{milk} \quad (S58)$$

The concentration of **milk fat** (g/L) was experimentally determined by the butyrous rate (g/kg) of each individual multiplying by the density of milk that was 1.031 kg/L and 1.034 kg/L for cows and goats (Park et al., 2007).

The concentration of total **milk proteins** (g/L) was experimentally determined from the protein rate (g/kg) of each individual multiplied by the density of milk (see above).

The concentration of **casein** was determined by multiplying the concentration of total milk proteins (g/L) by the percentage of casein in milk which is 88 and 65 % for cows and goats (Balthazar et al., 2017).

The concentration of **whey proteins** was determined by multiplying the concentration of total milk proteins (g/L) by the percentage of protein in milk that was in whey, i.e. 12 and 35 % for cows and goats (Balthazar et al., 2017).

- Affinity for fat and casein

Affinity of OTC for fat and casein were estimated according to Eq.45 and 46, respectively but from their logD values in milk:

$$\log(D) = \log(P) - \log(Z) \text{ (Shappell et al., 2017)}$$

- Affinity for calcium and magnesium

Association constant of magnesium and calcium was estimated according to Eq.47 and 48, respectively but from the pH of milk (see Table 1 in the main text).

- Affinity for whey proteins

Association constant of **whey proteins** was assumed to be equal to 0.010 L/g according to results of Shappell, Lupton and al (Shappell et al., 2017) (Lupton et al., 2018).

❖ **Free fraction**

In milk, the total concentration was:

$$C_{milk} = Cu_{milk} + Cb_{fat} + Cb_{casein} + Cb_{whey,prot} + Cb_{calcium} + Cb_{magnesium} \quad (S63)$$

So, unbound fraction in milk was:

$$\begin{aligned} fu_{milk} &= \frac{Cu_{milk}}{C_{milk}} \\ &= \frac{Cu_{milk}}{Cu_{milk} \times (1 + ka_{fat,MILK} \times Fat + ka_{casein,MILK} \times Casein + ka_{whey,prot} \times PRwhey + ka_{calcium,MILK} \times Calcium + ka_{magnesium,MILK} \times Magnesium)} \\ &= \frac{1}{(1 + ka_{fat,MILK} \times Fat + ka_{casein,MILK} \times Casein + ka_{whey,prot} \times PRwhey + ka_{calcium,MILK} \times Calcium + ka_{magnesium,MILK} \times Magnesium)} \end{aligned}$$

2.4.Establishment of the popPBPK Model

2.4.1. Parameters distribution

Table S3: Distributions of Parameters Used in Monte Carlo simulations for the PBPK Model of OTC in Cow. All parameters were assumed to follow a log-normal distribution

Parameter		Mean	CV (%)	1 st percentile	99 th percentile
CO (L/h/kg)		5.45	27	3.9241	9.9203
Ht		0.35	8.7	0.3260	0.3946
BW fraction	Blood	0.0452	20	0.0353	0.0687
	Lung	0.007	20	0.0054	0.0115
	Muscle	0.361	32	0.2695	0.5398
	Kidneys	0.0025	20	0.0020	0.0039
	Liver	0.0131	21	0.0100	0.0205
	Fat	0.1321	50	0.0755	0.3244
	Udder	0.032	25	0.0234	0.0562
	GI_{tract}	0.0216	25	0.0157	0.0380
	Intestines	0.0137	25	0.0100	0.0236
	Bones	0.0866	17	0.0713	0.1231
	Brain	0.0007	14	0.0006	0.0010
	Heart	0.0037	19	0.0029	0.0057
	Pancreas	0.0008	25	0.0006	0.0014

	Spleen	0.0016	25	0.0012	0.0028
CO fraction	Muscle	0.18	32	0.1250	0.3093
	Kidneys	0.07	90	0.0228	0.3319
	Liver	0.51	33	0.4072	0.6829
	Fat	0.074	24	0.0552	0.1220
	Udder	0.13	46	0.0791	0.3040
fu_p		0.81	3	0.8034	0.8196
k_{IM} (h⁻¹)		0.171	22	0.1296	0.2907
F_{IM}		0.885	11	0.8645	0.9048
CL_{plasma} (L/h/kg)		0.09	24	0.0670	0.1603
r (mm)		0.0025	30*	0.0017	0.0051
f_{alveoli}		0.7	30*	0.6217	0.8192
alb_p (g/L)		30.81	6	28.4531	35.2594
alb_{EW} (g/L)		14.52	22	10.9127	23.7461
Ca²⁺_{IW} (g/L)		0.0114	30*	0.0078	0.0230
Mg²⁺_{IW} (g/L)		0.024	30*	0.0161	0.0503
Ca²⁺_{MILK} (g/L)		0.08	13	0.0674	0.1061
Mg²⁺_{MILK} (g/L)		0.018	5	0.0169	0.0201
k_{muscle}		0.9	20	0.7092	1.3935
k_{lung}		2.3	20*	1.7618	3.7342
k_{kidneys}		6.62	25	1.3772	3.3109
k_{liver}		1.87	25	4.8321	11.8006
k_{fat}		0.09	47	0.0479	0.2406

*For parameters with no experimental data, the default values of CV were 30% for physiological data and 20% for chemical-related data.

Table S4:Distributions of Parameters Used in Monte Carlo simulations for the PBPK Model of OTC in Goat. All parameters were assumed to follow a log-normal distribution

Parameter		Mean	CV (%)	1 st percentile	99 th percentile
CO (L/h/kg)		8.17	22	6.2515	13.3100
Ht		0.3	30*	0.2285	0.4529
BW fraction	Blood	0.0549	9	0.0492	0.0662
	Lung	0.0122	19	0.0095	0.0194
	Muscle	0.3858	8	0.3609	0.4299
	Kidneys	0.0038	16	0.0031	0.0054
	Liver	0.0189	15	0.0157	0.0260
	Fat	0.0914	20	0.0727	0.1374
	Udder	0.0178	30	0.0122	0.0354
	GI tract	0.02787	30*	0.0190	0.0546
	Intestines	0.054	19	0.0430	0.0801
	Bones	0.098	16	0.0810	0.1372
	Brain	0.002	26	0.0015	0.0036
	Heart	0.004	21	0.0031	0.0064
	Pancreas	0.0009	6	0.0008	0.0010
	Spleen	0.0011	30*	0.0008	0.0021
CO fraction	Muscle	0.22	42	0.1383	0.4183
	Kidneys	0.1673	44	0.1019	0.3358
	Liver	0.33	37	0.2361	0.5267

	Fat	0.0833	77	0.0322	0.3491
	Udder	0.08	8	0.0732	0.0948
fup		0.8	20*	0.7508	0.8592
k_{IM} (h⁻¹)		0.45	30	0.3107	0.9353
F_{IM}		0.92	24	0.8946	0.9529
CL_{plasma} (L/h/kg)		0.14	24	0.1150	0.2057
r (mm)		0.0025	30*	0.0017	0.0051
f_{alveoli}		0.7	30*	0.6217	0.8192
alb_p (g/L)		31.8	13	26.7636	42.5948
alb_{EW} (g/L)		14.52	22	10.9127	23.7461
Ca²⁺_{IW} (g/L)		0.0114	30*	0.0078	0.0230
Mg²⁺_{IW} (g/L)		0.024	30*	0.0161	0.0503
Ca²⁺_{MILK} (g/L)		0.0931	3	0.0895	0.0994
Mg²⁺_{MILK} (g/L)		0.024	10	0.0212	0.0300
k_{muscle}		0.89	20	0.7013	1.3780
k_{lung}		2.27	20*	1.7388	3.6855
k_{kidneys}		6.54	25	1.3551	3.2578
k_{liver}		1.84	25	4.7737	11.6580
k_{fat}		0.09	47	0.0479	0.2406

*For parameters with no experimental data, the default values of CV were 30% for physiological data and 20% for chemical-related data.

3. Results

3.1. Model Calibration

3.1.1. Estimation of intramuscular absorption rate

OTC plasma concentrations of cow and goat of the current study were used to estimate the intramuscular absorption rate (k_{IM}) with the whole PBPK model by fixing all parameters except k_{IM} . The estimation k_{IM} for cow and goat are presented in Table S4. Individual fits are presented in Figures S1 and S2 for both species.

Table S5: k_{IM} estimation from experimental data

Species	Value (h^{-1})	RSE (%)	IIV SD (h^{-1})	IIV SD_RSE (%)
Cow	0.17	8.82	0.22	28.9
Goat	0.45	12.3	0.30	28.9

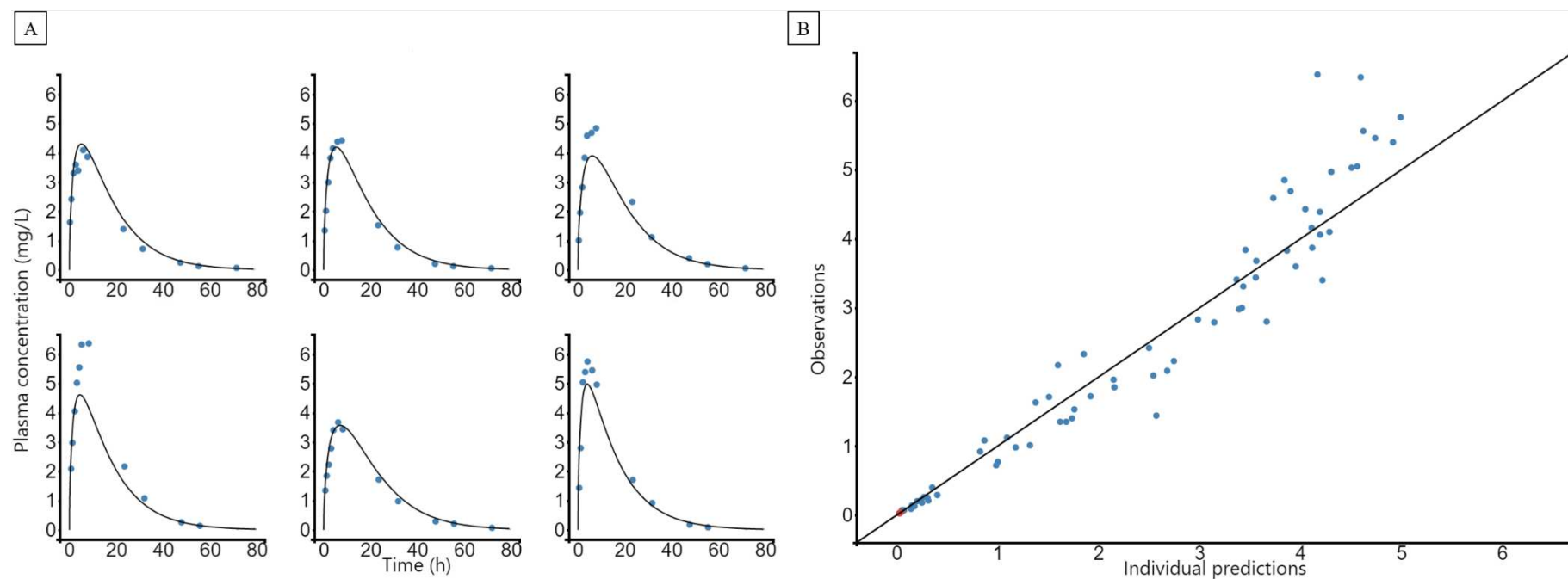


Figure S1: Cow (A) Individual fits of plasma concentrations after model calibration, with k_{IM} estimation (B) Observations versus predictions plot

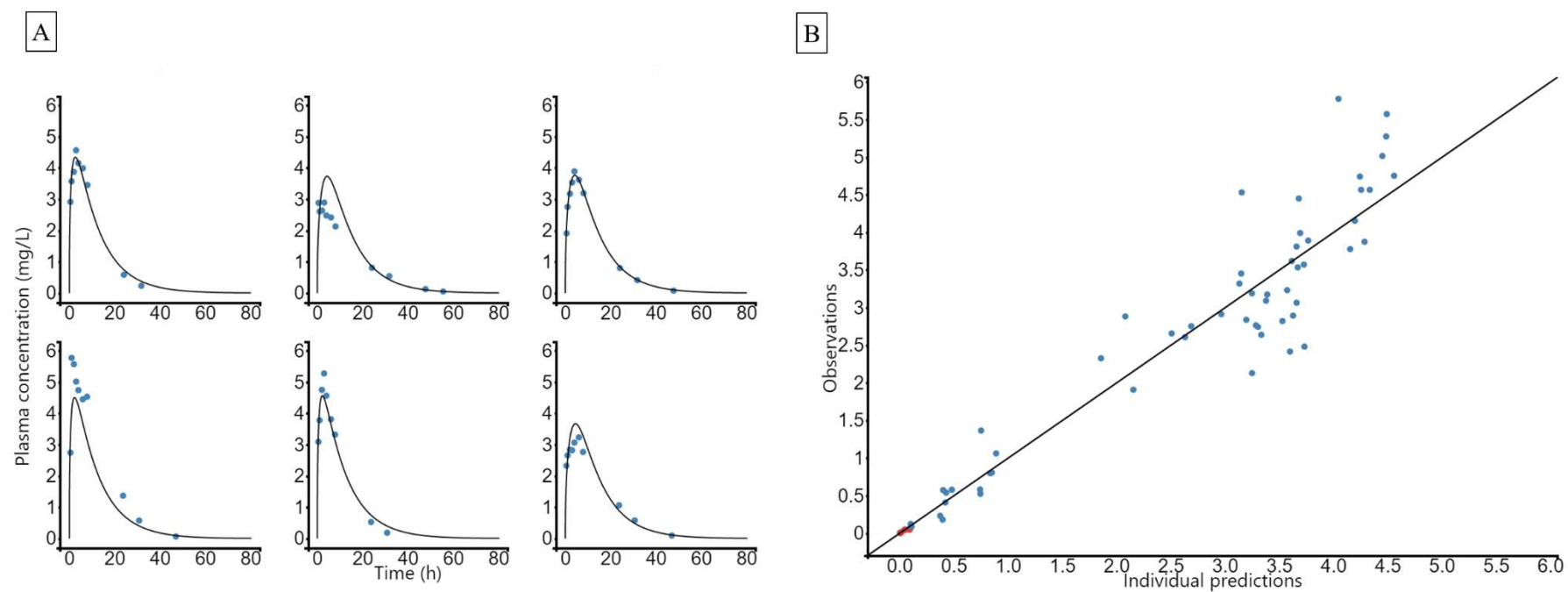


Figure S2: Goat (A) Individual fits of plasma concentrations after model calibration, with k_{IM} estimation B) Observations versus predictions plot

3.2. Model Evaluation: Validation and Sensitivity Analysis

3.2.1. External validation of the PBPK model

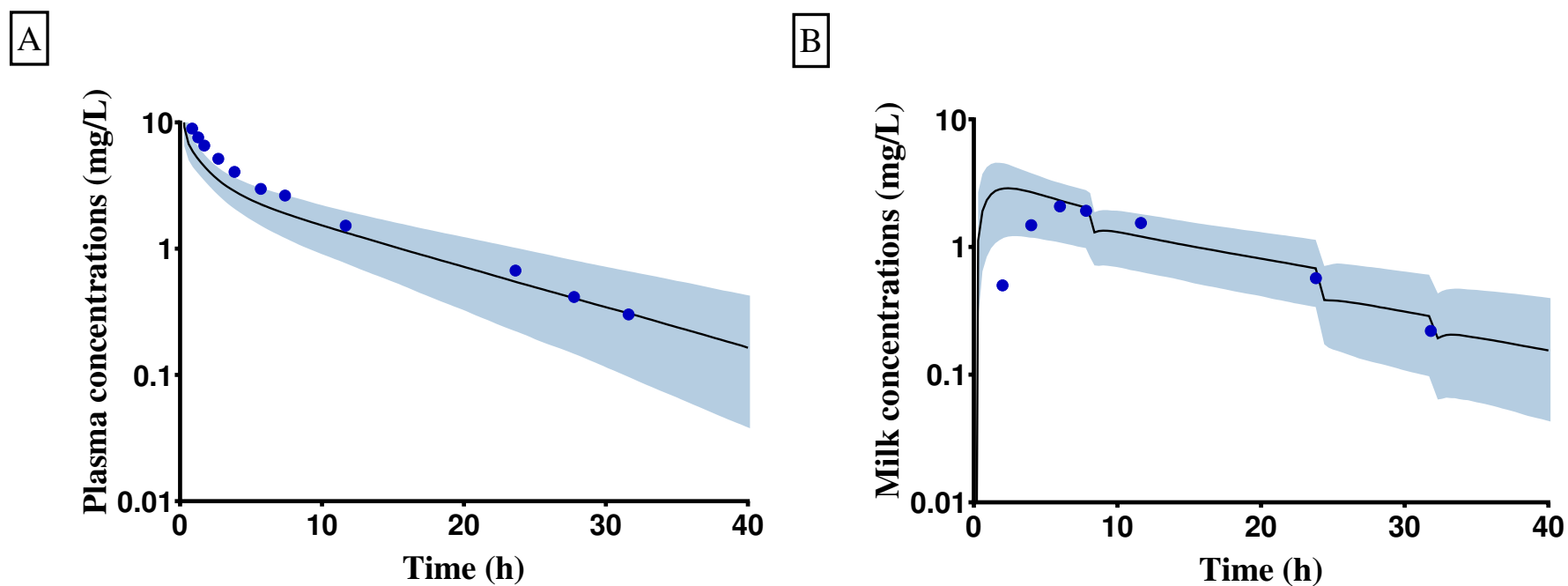


Figure S3: External validation with observed data of OTC in plasma (A) and milk (B) of cow after an IV of 5 mg/kg (Nouws et al., 1985a). The median is represented by a solid black line and the 90% prediction interval is represented by the blue area. The mean experimental data are represented by blue circles.

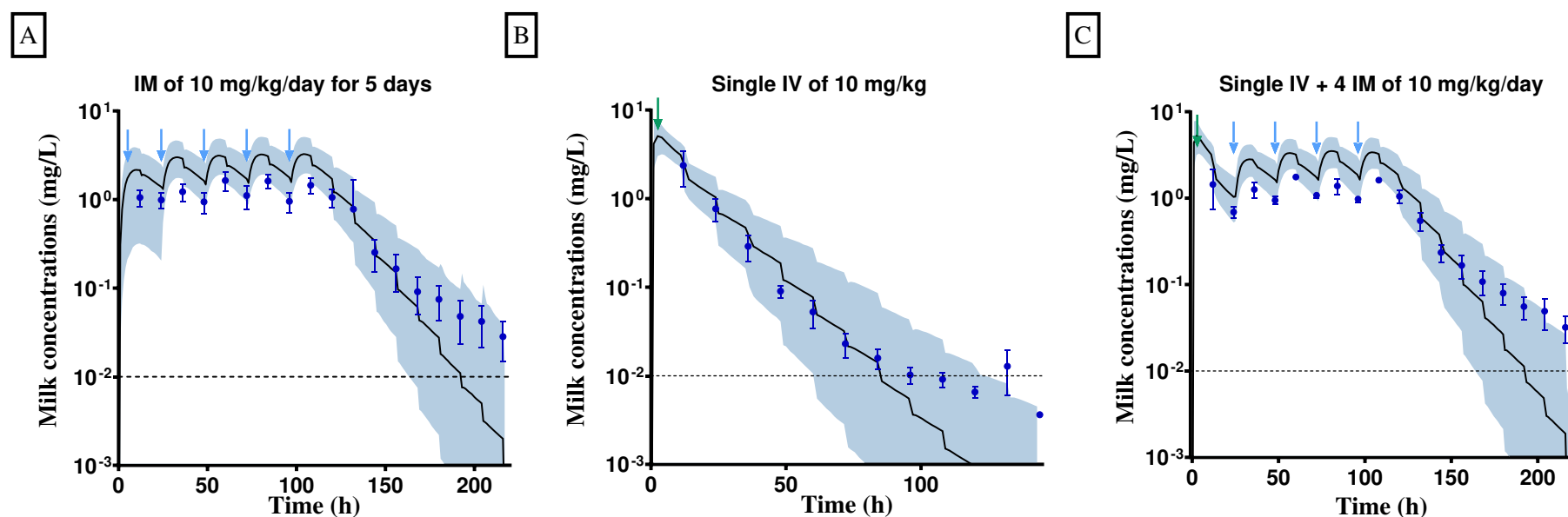


Figure S4: External validation with observed data of OTC in cow milk after IM of 10 mg/kg/day for 5 days (A) after an IV of 10 mg/kg (B) after an IV of 10 mg/kg followed by IM of 10 mg/kg/day for 4 days (C) (unpublished data). The median is represented by a solid black line and the 90% prediction interval is represented by the blue area. The mean and standard deviation of experimental data are represented by blue circles and bars. IM administrations are presented by blue arrows and IV administration by green arrows. The lower limit of quantification (0.01mg/L) is represented by a black dotted line. After single IV administration (B), 1 animal was below the limit of quantification (BLQ) at 84h, 2 animals were BLQ at 96h, 3 animals were BLQ at 108h, 4 animals were BLQ at 120h, 2 animals were BLQ at 132h, 4 animals were BLQ at 144h.

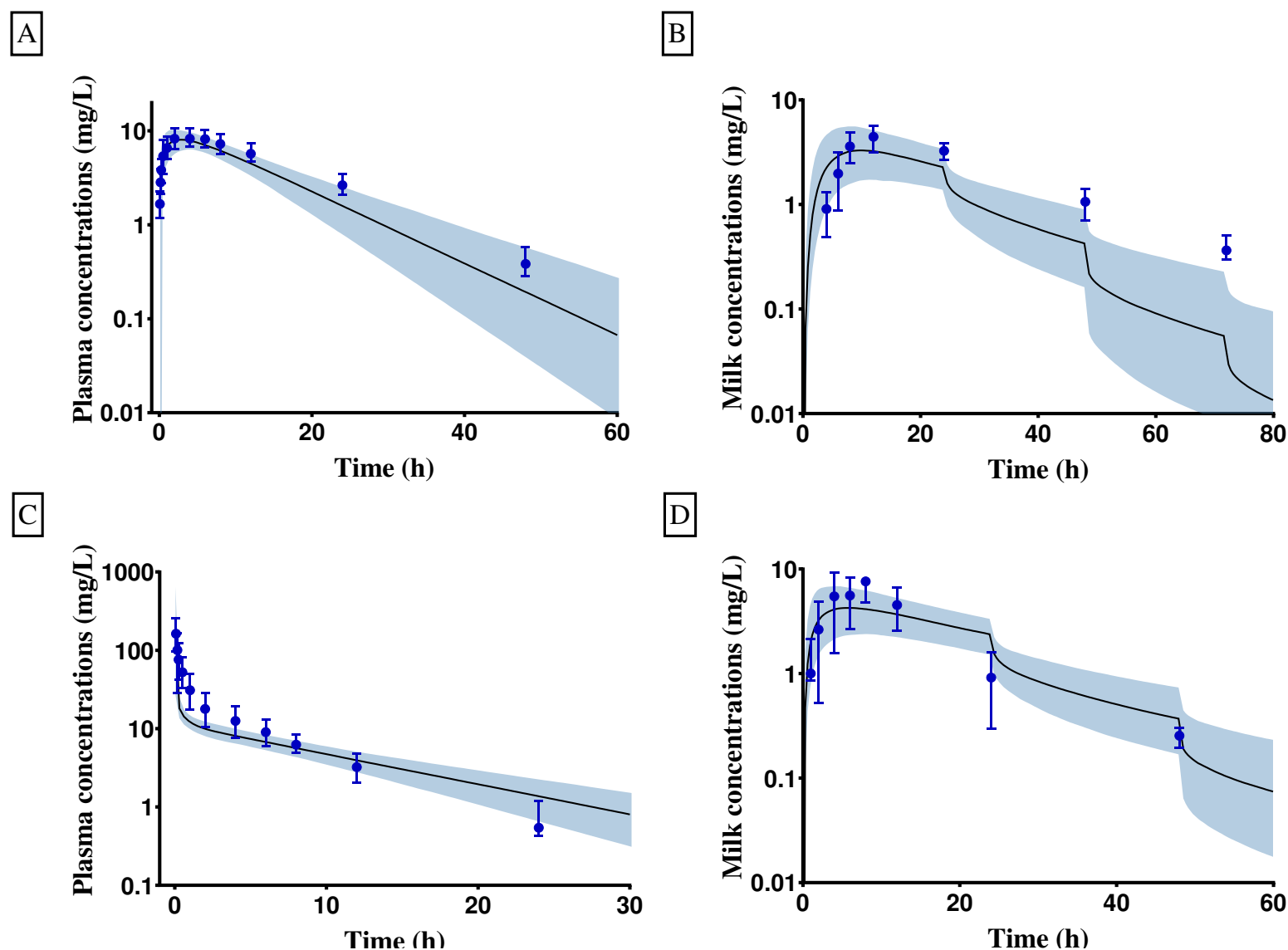


Figure S5: External validation with observed data of OTC in plasma (left panels) and milk (right panels) of goat after an IM (top panel) or IV (bottom panel) of 20 mg/kg (Rule et al., 2001). The median is represented by a dashed line and the 90% prediction interval is represented by the blue area. The mean and standard deviation of experimental data are represented by blue circles and bars.

3.3. Partition coefficient simulations

3.3.1. Partition coefficient (k_{tissue}) calculation based on Rodger and Rowland's equations

Table S6: Partition coefficient (k_{tissue}) based on literature or on Rodger and Rowland's equations

Tissue	Partition coefficient (literature)	Partition coefficient (RR)
muscle	0.90	0.43
lung	2.30	0.84
liver	1.87	0.98
kidneys	6.62	1.01
fat	0.09	0.11

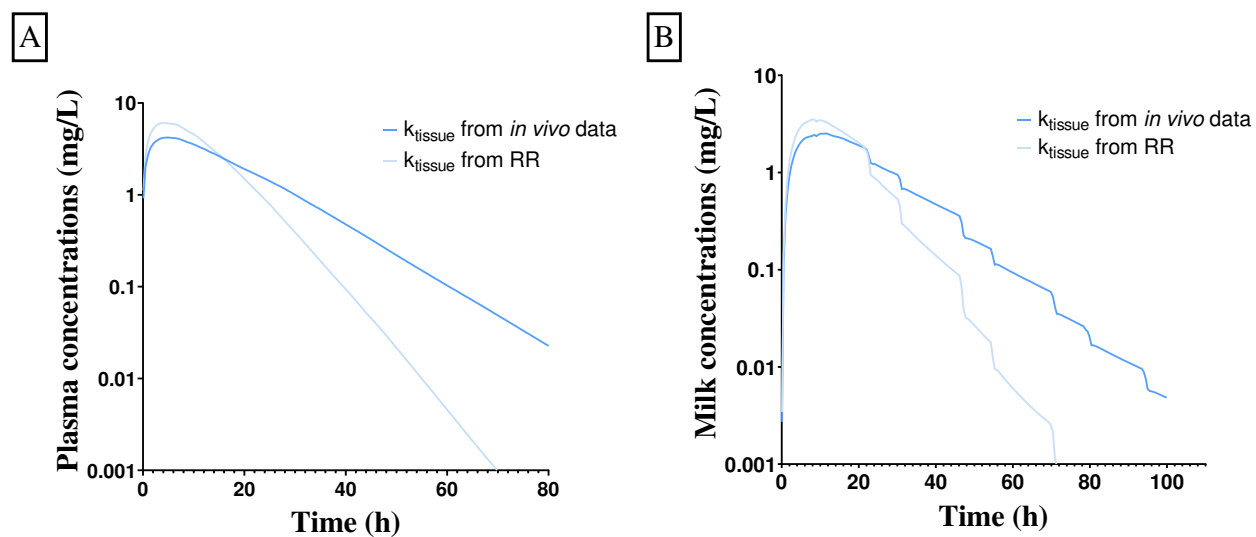


Figure S6: Influence of the partition coefficient (K_{tissue}) values on the pharmacokinetics of OTC in cow plasma (A) and milk (B). K_{tissue} were from *in vivo* data or estimated from Rogers and Rowland's equations (Rodgers et al., 2005).

4. PBPK Model Code

The general mlxtran code for Monolix software of the physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for oxytetracycline in cow is presented below. Parameter values used in the model code are for cow. This code can be adapted to the goat by taking the parameter values presented in tables Table S1 and Table 1.

```

1 ;DESCRIPTION: PBPK of Oxytetracycline (OTC) administered to cows
2 ;Dose of OTC = 10 mg/kg in single dose
3 ;Administration way = IM at several injection points
4 ;Number of cows = 6
5 ; =====
6 ; ----- Parameters and definitions ----- ;;
7 ; =====
8 ;Input parameters with IIV or uncertainty
9 [INDIVIDUAL]
10 input = {AlbEW_pop, Albp_pop, BFfat_pop, BFkidneys_pop, BFliver_pop, BFmuscle_pop, BFudder_pop, CLp_pop, CO_pop, CalciumIW_pop, CalciumMILK_pop, MagnesiumIW_pop, MagnesiumMILK_pop, falveoli_pop, ffat_pop,
11           fkidneys_pop, fliver_pop, flung_pop, fmuscle_pop, fudder_pop, fup_pop, hmtc_pop, kfapop, kkidneys_pop, kliver_pop, klung_pop, kmuscle_pop, r_pop, FIM_pop, kIM_pop, fGitract_pop, fbones_pop, fbrain_pop, fheart_pop,
12           fintestines_pop, fpancreas_pop, fspleen_pop, omega_fGitract, omega_fintestines, omega_fbones, omega_fbrain, omega_fheart, omega_fpancreas, omega_fspleen, omega_fudder, omega_fliver, omega_fkidneys, omega_flung,
13           omega_fmuscle, omega_ffat, omega_falveoli, omega_CO, omega_fup, omega_hmtc, omega_kmuscle, omega_kIM, omega_FIM, omega_klung, omega_kliver, omega_kkidneys, omega_kfat, omega_CLp, omega_Albp, omega_Albp,
14           omega_CalciumIW, omega_MagnesiumIW, omega_CalciumMILK, omega_MagnesiumMILK, omega_r, omega_BFliver, omega_BFudder, omega_BFkidneys, omega_BFfat, omega_BFmuscle, fblood_pop, omega_fblood}
15 DEFINITION:
16 AlbEW = {distribution=logNormal, typical=AlbEW_pop, sd=omega_AlbEW} ; Extracellular Albumin (g/L)
17 Albp = {distribution=logNormal, typical=Albp_pop, sd=omega_Albp} ; Plasma Albumin (g/L)
18 BFfat = {distribution=logitNormal, typical=BFfat_pop, sd=omega_BFfat} ; Fat Blood Flow (L/h)
19 BFkidneys = {distribution=logitNormal, typical=BFkidneys_pop, sd=omega_BFkidneys} ; Kidneys Blood Flow (L/h)
20 BFliver = {distribution=logitNormal, typical=BFliver_pop, sd=omega_BFliver} ; Liver Blood Flow (L/h)
21 BFmuscle = {distribution=logitNormal, typical=BFmuscle_pop, sd=omega_BFmuscle} ; Muscle Blood Flow (L/h)
22 BFudder = {distribution=logitNormal, typical=BFudder_pop, sd=omega_BFudder} ; Udder Blood Flow (L/h)
23 CLp = {distribution=logNormal, typical=CLp_pop, sd=omega_CLp} ; Plasma Clearance (L/h/kg)
24 CO = {distribution=logNormal, typical=CO_pop, sd=omega_CO} ; Cardiac Output (L/h/kg)
25 CalciumIW = {distribution=logNormal, typical=CalciumIW_pop, sd=omega_CalciumIW} ; Intracellular water free Calcium (g/L)
26 CalciumMILK = {distribution=logNormal, typical=CalciumMILK_pop, sd=omega_CalciumMILK} ; Milk free Calcium (g/L)
27 MagnesiumIW = {distribution=logNormal, typical=MagnesiumIW_pop, sd=omega_MagnesiumIW} ; Intracellular water free Magnesium (g/L)
28 MagnesiumMILK = {distribution=logNormal, typical=MagnesiumMILK_pop, sd=omega_MagnesiumMILK} ; Milk free Magnesium (g/L)
29 falveoli = {distribution=logitNormal, typical=falveoli_pop, sd=omega_falveoli} ; Alveolar fraction
30 ffat = {distribution=logitNormal, typical=ffat_pop, sd=omega_ffat} ; Fat fraction (kg)
31 fkidneys = {distribution=logitNormal, typical=fkidneys_pop, sd=omega_fkidneys} ; Kidneys fraction (kg)
32 fliver = {distribution=logitNormal, typical=fliver_pop, sd=omega_fliver} ; Liver fraction (kg)
33 flung = {distribution=logitNormal, typical=flung_pop, sd=omega_flung} ; Lung fraction (kg)
34 fmuscle = {distribution=logitNormal, typical=fmuscle_pop, sd=omega_fmuscle} ; Muscle fraction (kg)
35 fudder = {distribution=logitNormal, typical=fudder_pop, sd=omega_fudder} ; Udder fraction (kg)
36 fup = {distribution=logitNormal, typical=fup_pop, sd=omega_fup} ; Fraction unbound in plasma

```

```

33 hmtc = {distribution=logitNormal, typical=hmtc_pop, sd=omega_hmtc} ; Haematocrit
34 kfat = {distribution=logNormal, typical=kfat_pop, sd=omega_kfat} ; Fat partition coefficient
35 kkidneys = {distribution=logNormal, typical=kkidneys_pop, sd=omega_kkidneys} ; Kidneys partition coefficient
36 kliver = {distribution=logNormal, typical=kliver_pop, sd=omega_kliver} ; Liver partition coefficient
37 klung = {distribution=logNormal, typical=klung_pop, sd=omega_klung} ; Lung partition coefficient
38 kmuscle = {distribution=logNormal, typical=kmuscle_pop, sd=omega_kmuscle} ; Muscle partition coefficient
39 r = {distribution=logNormal, typical=r_pop, sd=omega_r} ; Capillary radius (mm)
40 FIM = {distribution=logitNormal, typical=FIM_pop, sd=omega_FIM} ; IntraMuscular Bioavalability
41 kIM = {distribution=logNormal, typical=kIM_pop, sd=omega_kIM} ; IntraMuscular absorption rate (1/h)
42 fGItract = {distribution=logitNormal, typical=fGItract_pop, sd=omega_fGItract} ; Gastro Intestinal Traction fraction (kg)
43 fbones = {distribution=logitNormal, typical=fbones_pop, sd=omega_fbones} ; Bones fraction (kg)
44 fbrain = {distribution=logitNormal, typical=fbrain_pop, sd=omega_fbrain} ; Brain fraction (kg)
45 fheart = {distribution=logitNormal, typical=fheart_pop, sd=omega_fheart} ; Heart fraction (kg)
46 fintestines = {distribution=logitNormal, typical=fintestines_pop, sd=omega_fintestines} ; Intestines fraction (kg)
47 fpancreas = {distribution=logitNormal, typical=fpancreas_pop, sd=omega_fpancreas} ; Pancreas fraction (kg)
48 fspleen = {distribution=logitNormal, typical=fspleen_pop, sd=omega_fspleen} ; Spleen fraction (kg)
49 fblood = {distribution=logitNormal, typical=fblood_pop, sd=omega_fblood} ; Blood fraction (kg)
50
51 ;Residual error
52 [LONGITUDINAL]
53 input = {bmilk, bvenous} ; Analytical method intermediary precision
54
55 ;Regressors
56 TimelastM = {use=regressor} ; Time of the Last Milking (h)
57 IMI = {use=regressor} ; Inter-Milking Interval (h)
58 Vmilk = {use=regressor} ; Volume of Milk Collected (L) (Vmilkobs in the text)
59 Vmilkprec={use=regressor} ; Volume of Milk Collected at the precedent milking (L)
60 BW = {use=regressor} ; Body Weight (kg)
61 Fat = {use=regressor} ; Fat concentration in Milk (g/L)
62 Casein = {use=regressor} ; Casein concentration in Milk (g/L)
63 Wheyprot = {use=regressor} ; Whey proteins concentration in Milk (g/L)
64
65 ;Administration and milking times
66 PK:
67 depot(adm=1, target=Adepot, p=FIM) ; IM Administration in the Depot compartment at T=0h
68 empty(adm=2, target=Acistern) ; Emptying the Cisternal sub-compartment at milking
69 empty(adm=2, target=Aalveoli) ; Emptying the Alveolar sub-compartment at milking
70
71 EQUATION:
72 odeType=stiff
73 ;=====
74 ; ----- Physico chemical properties ----- ;;
75 ; =====
76 logP = -4.54 ; Logarithm of octanol-water Partition Coefficient
77 P = 10^logP ; Octanol-water Partition Coefficient
78 pkaAcid = 7.25 ; Acid pKa
79 pkaBase = 5.80 ; Basic pKa

```

```

80 ; =====
81 ; ----- Tissues volumes (L) ----- ;;
82 ; =====
83 ;Density (kg/L)
84 dnonfat = 1.06 ; Non fat tissues
85 dfat = 0.9 ; Fat
86 drest = 1 ; Lumping compartment
87 ;Fractions of BW (kg)
88 fblood=4.52/100 ; Total blood
89 farterial = 0.25*fblood ; Arterial blood
90 fvenous = 0.75*fblood ; Venous blood
91 fudder = (3.2/100) ; Udder
92 fliver = (1.31/100) ; Liver
93 fkidneys = (0.25/100) ; Kidneys
94 flung = (0.7/100) ; Lung
95 fmuscle = (36.1/100) ; Muscle
96 ffat = (13.21/100) ; Fat
97 fGItract = 2.16/100 ; Gastro-intestinal Tract
98 fintestines = 1.37 /100 ; Intestines
99 fbones = 8.66 /100 ; Bones
100 fcarcass = 0 /100 ; Carcass
101 fbrain = 0.07 /100 ; Brain
102 fheart = 0.37 /100 ; Heart
103 fpancreas = 0.08 /100 ; Pancreas
104 fspleen = 0.16 /100 ; Spleen
105 frest = (100 - (1.13+3.4+3.2+1.31+0.25+0.7+36.1+13.21))/100 ; Fraction of the lumping compartment (kg)
106 frestofrest = (frest - (2.16+1.37+8.66+0.07+0.37+0.08+0.16)/100) ; Fraction of the rest of the lumping compartment (kg)
107 fadjust = (arterial+fvenous+fudder+fliver+fkidneys+flung+fmuscle+ffat+fGItract+fintestines+fbones+fbrain+fheart+fpancreas+fspleen+frestofrest) ; Equation to adjust the sum of tissue volumes to 1
108
109 ;Volumes of tissue (L)
110 Varterial = (arterial/fadjust) * BW / dnonfat ; Arterial blood
111 Vvenous = (fvenous/fadjust) * BW / dnonfat ; Venous blood
112 Vudder = (fudder/fadjust) * BW / dnonfat ; Udder
113 Vliver = (fliver/fadjust) * BW / dnonfat ; Liver
114 Vkidneys = (fkidneys/fadjust) * BW / dnonfat ; Kidneys
115 Vlung = (flung/fadjust) * BW / dnonfat ; Lung
116 Vmuscle = (fmuscle/fadjust) * BW / dnonfat ; Muscle
117 Vfat= (ffat/fadjust) * BW / dfat ; Fat
118 Vrest = (frest/fadjust) * BW/ drest ; Lumping compartment
119 VGItract = (fGItract/fadjust) * BW /dnonfat ; Gastro Intestinal Tract
120 Vintestines = (fintestines/fadjust) * BW /dnonfat ; Intestines
121 Vbones = (fbones/fadjust) * BW /dnonfat ; Bones
122 Vcarcass = (fcarcass/fadjust) * BW /dnonfat ; Carcass
123 Vbrain = (fbrain/fadjust) * BW/dnonfat ; Brain
124 Vheart = (fheart/fadjust) * BW/dnonfat ; Heart
125 Vpancreas = (fpancreas/fadjust) * BW/dnonfat ; Pancreas
126 Vspleen = (fspleen/fadjust) * BW/dnonfat ; Spleen

```

```

127 Vrestofrest = (frestofrest/fadjust) * BW/drest ; Rest of the Lumping compartment
128 Vpoorly_perfused_tissues = (Vbones+Vcarcass+Vskin+Vheart+Vpancreas+Vspleen+Vrestofrest) ; Volume of poorly perfused tissues (L)
129 Vrichly_perfused_tissues = (VGIntestines+Vbrain) ; Volume of richly perfused tissues (L)
130
131 ; Production of milk of cow
132 falveoli = 0.7 ; Alveolar fraction
133 fresidual = 0.05 ; Residual fraction
134 ; Production of milk of goat
135 ; Residual fraction of milk depending on inter-milking interval (IMI)
136 ;fresidual16 = 0.13 ; Residual fraction for an IMI of 16h
137 ;fresidual8 = 0.19 ; Residual fraction for an IMI of 8h
138 ;if IMIprec>=14
139 ;fresidual = fresidual16
140 ;else
141 ;fresidual = fresidual8
142 ;end
143
144 RT = t - TimelastM ; Time relative to the last milking (h)
145 ; Volumes of milk (L)
146 Vmilktprec=Vmlkprec/(1-fresidual) ; Volume of total milk contained in the udder at the end of the precedent milking (L)
147 Vresidualprec=fresidual*Vmilktprec ; Volume of residual milk at the end of the precedent milking (L)
148 VmilkT= (1-fresidual) * Vresidualprec+ RT*(Vmilk-(1-fresidual) * Vresidualprec)/IMI ; Linear production of milk volume produced over a milking interval (L) (Vmilk(t) in the text)
149 VmilktoT=VmilkT/(1-fresidual) ; Linear production of total milk volume contained in the udder over a milking interval (L) (Vmilk,tot(t) in the text)
150 ValveoliT= (falveoli-fresidual)*VmilktoT ; Linear production of milk volume in the alveolar space over a milking interval (L) (Valveolar(t) in the text)
151 VcisternT= (1-falveoli)*VmilktoT ; Linear production of milk volume in the cisternal space over a milking interval (L) (Vcisternal(t) in the text)
152 VresidualT=fresidual*VmilktoT ; Linear production of residual milk volume over a milking interval (L)
153 ddt_Vexcre = Vmilk/(IMI+0.001) ; Total volume of milk excreted (L)
154 ; =====
155 ; ----- Tissues blood flows (L/h) ----- ;;
156 ; =====
157 CO = 5.45 ; Cardiac Output (L/h/kg)
158 Qtot = CO * BW ; Individual Cardiac Output (L/h)
159
160 ;Fraction of Individual Cardiac Output (L/h)
161 BFliver = (51/100) ; Liver
162 BFKidneys = (7/100) ; Kidneys
163 BFudder = (13/100) ; Udder
164 BFmuscle = (18/100) ; Muscle
165 BFFat = (7.4/100) ; Fat
166 BFrest = (100-(51+7+13+18+7.4))/100 ; Lumping compartment
167 BFadjust =(BFKidneys + BFliver + BFudder + BFmuscle + BFFat + BFrest) ; Equation to adjust the sum of tissue blood flows to 1
168
169 ;Blood flow (L/h)
170 Qliver = (BFliver/BFadjust) * Qtot ; Liver
171 Qkidneys = (BFKidneys/BFadjust) * Qtot ; Kidneys
172 Qudder = (BFudder/BFadjust) * Qtot ; Udder
173 Qmuscle = (BFmuscle/BFadjust) * Qtot ; Muscle

```



```

174 Qfat = (BFat/BFadjust) * Qtot ; Fat
175 Qrest = (BFrest/BFadjust) * Qtot ; Lumping compartment
176 Qarterial = Qtot ; Arterial blood
177 Qvenous = Qtot ; Venous blood
178 Qlung = Qtot ; Lung
179 Qresidual = 1000 ; Flow rate between alveolar space and residual space (L/h)
180 Qcistern = (1-falveoli)*(Vmilk)/IMI ; Milk production rate from the cistern (L/h)
181 ; =====
182 ; ----- Blood compartment----- ;;
183 ; =====
184 fup = 0.81 ; Fraction unbound in plasma
185 fIWBC = 0.603 ; Fraction of intracellular water in blood cells
186 fNLBC = 0.0017 ; Fraction of neutral lipids in blood cells
187 fNPBC = 0.0029 ; Fraction of neutral phospholipids in blood cells
188 fNPP = 0.0013 ; Fraction of neutral phospholipids in plasma
189 fNLp = 0.0023 ; Fraction of neutral lipids in plasma
190 hmtc = 0.35 ; Haematocrit
191 pHBC = 7.22 ; Blood cells pH
192 pHp = 7.4 ; Plasma pH
193 pHIW = 7.0 ; Udder intracellular water pH
194 ; Intermediary calculations
195 a = pkaBase - pHBC
196 b = pHBC - pkaAcid
197 c = pkaBase - pHp
198 d = pHp - pkaAcid
199 e = pkaBase-pHIW
200 f = pHIW-pkaAcid
201 ; Ionisation ratio
202 V = 1 + 10^a + 10^b ; In blood cells
203 W = 1 + 10^c + 10^d ; In plasma
204 X = 1 + 10^e + 10^f ; In intracellular water of udder
205 kmuscle = 0.90 ; Partition coefficient between muscle and plasma
206 kumuscle = kmuscle / fup ; Partition coefficient between muscle and unbound plasma
207 fEWmuscle = 0.1180 ; Fraction of extracellular water in muscle
208 fIWmuscle = 0.6300 ; Fraction of intracellular water in muscle
209 fNLmuscle = 0.01 ; Fraction of neutral lipids in muscle
210 fNPmuscle = 0.0072 ; Fraction of neutral phospholipids in muscle
211 kuBC = V/W * fIWBC + ( P * fNLBC + (0.3 * P + 0.7) * fNPBC ) / W ; Parition coefficient between unbound plasma and blood cells
212 EP = kuBC * fup ; Erythrocytes to plasma ratio
213 BP = (EP-1) * hmtc + 1 ; Blood to plasma ratio
214 ; =====
215 ; ----- Muscular depot compartment parameters----- ;;
216 ; =====
217 kIM = 0.17 ; IntraMuscular absorption rate (1/h)
218 ; =====
219 ; ----- Partition coefficients----- ;;
220 ; =====

```

```

221 ; Partition coefficient between tissue and plasma
222 ; kmuscle defined in blood section;
223 klung= 2.30 ; Lung
224 kkidneys= 6.62 ; Kidneys
225 kliver= 1.87 ; Liver
226 kfat= 0.09 ; Fat
227 krest = (Vrichly_perfused_tissues*kkidneys+Vpoorly_perfused_tissues*kmuscle)/(Vpoorly_perfused_tissues+Vrichly_perfused_tissues) ; Lumping compartment
228 ; =====
229 ; ----- Extraction ratios----- ;;
230 ; =====
231 fekidneys=0.85 ; Dose fraction excreted unchanged in the urines
232 febile=1-fekidneys ; Dose fraction excreted unchanged in the bile
233 CLp = 0.09 ; Plasma Clearance (L/h/kg)
234 CLplasmatotale=CLp*BW ; Total Plasma Clearance (L/h)
235 ERkidneys = fekidneys * CLplasmatotale /(BP * Qkidneys) ; Extraction ratio of kidneys (ERblood,kidneys in the text)
236 ERliver = febile * CLplasmatotale /(BP * Qliver) ; Extraction ratio of liver (ERblood,liver in the text)
237 ; =====
238 ; ----- Udder sub-compartments ----- ;;
239 ; =====
240 ; -----Sub-compartments-----;
241 ;VASC= vascular space of udder
242 ;EW = extracellular water of udder
243 ;IW = intracellular water of udder
244 ;alveolar= milk in alveolar space
245 ;residual= milk remains in alveolar space after milking
246 ;cisternal= milk in cisternal space
247 ;-----Ionisation rates-----;
248 pHEW = 7.4 ; Extracellular water of udder pH
249 ;pHIW defined in section blood
250 pHmilk = 6.68 ; Milk pH
251 ; Intermediary calculations
252 g = pKaBase-pHEW
253 h = pHEW-pKaAcid
254 i = pKaBase-pHmilk
255 j = pHmilk-pKaAcid
256 ; Ionisation ratio
257 Y = 1 + 10^g + 10^h ; In extracellular water of udder
258 Z = 1 + 10^i + 10^j ; In milk
259 logD=logP-log10(Z) ; Distribution coefficient in milk
260 logDiw=logP-log10(X) ; Distribution coefficient in intracellular water of udder
261 ;-----Udder composition-----;
262 fvasc = 0.12 ; Vascular fraction
263 fvascLobules = 0.98 ; Udder blood flow fraction to lobules
264 fEW = 0.44 ; Fraction of extracellular water in udder
265 fIW = 0.24 ; Fraction of intracellular water in udder
266 fNL = 0.0120 ; Fraction of neutral lipids in udder
267 fNP = 0.0094 ; Fraction of neutral phospholipids in udder

```

268	AlbEW = 14.52 ; Extracellular Albumin (g/L)
269	Albp = 30.81 ; Plasma Albumin (g/L)
270	FatIW = Fat ; Fat concentration in intracellular water of udder (g/L)
271	CaseinIW = Casein ; Casein concentration in intracellular water of udder (g/L)
272	WheyprotIW = Wheyprot ; Whey proteins concentration in intracellular water of udder (g/L)
273	CalciumIW = 0.0114 ; Free calcium concentration in intracellular water of udder (g/L)
274	MagnesiumIW = 0.024 ; Free Magnesium concentration in intracellular water of udder (g/L)
275	CalciumMILK = 0.08 ; Free calcium concentration in milk (g/L)
276	MagnesiumMILK = 0.018 ; Free magnesium concentration in milk (g/L)
277	MWcalcium = 40 ; Molecular weight of calcium (g/mol)
278	MWmagnesium = 24 ; Molecular weight of magnesium (g/mol)
279	-----Affinity constants----- ;
280	kaalb = (1/fup-1-((P*fNLP+(0.3*P+0.7)*fNPP)/W))*1/Albp ; Affinity constant for albumin (L/g)
281	; Intermediary calculations
282	k= 0.49* logD - 3.112
283	l= 0.49* logDiw - 3.112
284	m= 0.29 * logD - 2.09
285	n= 0.29 * logDiw - 2.09
286	o = 0.7085 * pHmilk - 2.0478
287	p = 0.7085 * pHIW - 2.0478
288	kafatMILK=10^k ; Affinity constant for milk fat (L/g)
289	kafatIW=10^l ; Affinity constant for intracellular water fat (L/g)
290	kacaseinMILK=10^m ; Affinity constant for milk casein (L/g)
291	kacaseinIW=10^n ; Affinity constant for intracellular water casein (L/g)
292	kamagnesiumMILK= (10^o)/MWmagnesium ; Affinity constant for milk magnesium (L/g)
293	kamagnesiumIW = (10^p)/MWmagnesium ; Affinity constant for intracellular water magnesium (L/g)
294	kacalciumMILK = (10^o)/MWcalcium ; Affinity constant for milk calcium (L/g)
295	kacalciumIW = (10^p)/MWcalcium ; Affinity constant for intracellular water calcium (L/g)
296	kawheyprotMILK = 0.010 ; Affinity constant for milk whey proteins (L/g)
297	kawheyprotIW = kawheyprotMILK ; Affinity constant for intracellular whey proteins (L/g)
298	-----Free fractions-----;
299	fuEW = 1/(1+kaalb*AlbEW) ; Free fraction in extracellular water
300	fuiW = 1/((1/fiW*(fiW+(P*fNL+(0.3*P+0.7)*fNP)/X))+ kafatIW * FatIW + kacaseinIW * CaseinIW + kawheyprotIW * WheyprotIW + kacalciumIW * CalciumIW + kamagnesiumIW * MagnesiumIW) ; Free fraction in intracellular water
301	fumilk = 1/(1 + kafatMILK * Fat + kacaseinMILK * Casein + kawheyprotMILK * Wheyprot + kamagnesiumMILK * MagnesiumMILK + kacalciumMILK * CalciumMILK) ; Free fraction in milk
302	-----EW compartment parameters-----;
303	Vvasc = fvasc * Vudder ; Vascular space volume (L)
304	KEWB = (1+kaalb*AlbEW)/(BP/fup) ; Ratio between the total extracellular water concentration and the total blood concentration in the vascular space
305	VEW = fEW * Vudder ; Extracellular water volume (L)
306	VEWeff = VEW + Vvasc/KEWB ; Volume of effective extracellular space (combination of EW and VASC)
307	-----IW compartment parameters-----;
308	VIW = fiW * Vudder ; Intracellular water volume (L)
309	-----Passive diffusion across udder membrane (L/h)-----;
310	Papp = 0.00000014 ; PAMPA permeability (cm/s)
311	VvascCap = fvascLobules * fvasc * Vudder * 1000000 ; Volume of capillaries to lobules (mm³)
312	r= 0.0025 ; Capillary radius (mm)
313	SA= (2*VvascCap/r)*0.01 ; Surface area (mm²)
314	CLdiffsin = Papp*SA*3600/1000 ; Passive milk clearance across sinusoidal membrane (L/h)

```

315 CLdiffcan= CLdiffsin ; Passive milk clearance accross canalicular membrane (L/h)
316 ; =====
317 ; ----- Concentration of the drug in compartments ----- ;;
318 ; =====
319 ; Total concentrations (mg/L)
320 Cvenous = Avenous/Vvenous ; Venous blood
321 Cvenousp = Avenous/(Vvenous * BP) ; Venous plasma
322 Carterial = Aarterial/Varterial ; Arterial blood
323 Ckidneys = Akidneys/Vkidneys ; Kidneys
324 Cliver = Aliver/Vliver ; Liver
325 Clung = Alung/Vlung ; Lung
326 Cmuscle = Amuscle/Vmuscle ; Muscle
327 Cfat = Afat/Vfat ; Fat
328 Crest = Arest/Vrest ; Lumping compartment
329 CEW = AEW/VEWeff ; Extracellular water of udder
330 CIW = AIW/VIW ; Intracellular water of udder
331 Calveoli = Aalveoli/ValveoliT ; Alveolar milk
332 Cresidual = Aresidual/VresidualT ; Residual milk
333 Ccistern = Acistern/VcisternT ; Cisternal milk
334 Cmilktot = (Aalveoli + Aresidual + Acistern)/(Vmilkt+VresidualT) ; Total milk contains in the udder
335 Cmilkt=(Aalveoli + Acistern)/Vmilkt ; Milk produced
336 Cexcretee=Aexcretee/Vexcre ; Total milk excreted
337 ; Free concentrations (mg/L)
338 Cuvenousp = Cvenousp*fup ; Free concentration in venous plasma
339 CuEW = AEW/VEWeff * fuEW ; Free concentration in extracellular water of udder
340 CuIW = AIW/VIW * fuiW ; Free concentration in intracellular water of udder
341 Cumilktot = Cmilktot * fumilk ; Free concentration in total milk contains in the udder
342 Cumilkt = Cmilkt*fumilk ; Free concentration in milk produced
343 Cualveoli = Calveoli * fumilk ; Free concentration in alveolar milk
344 Curesidual = Cresidual*fumilk ; Free concentration in residual milk
345 Cucistern = Ccistern*fumilk ; Free concentration in cisternal milk
346 ; =====
347 ; ----- ODE Equation for the amount of drug in tissues -----;;
348 ; =====
349 ddt_Adepot = -kIM * Adepot ; Rate of change in depot compartment (mg/h)
350 ddt_Avenous = kIM * Adepot + Qkidneys * Ckidneys/kkidneys * BP + Qliver * Cliver/kliver * BP + Qrest * Crest/krest * BP + Qmuscle * Cmuscle/kmuscle * BP + Qfat * Cfat/kfat * BP + Qudder * CuEW/fuEW * 1/KEWB - Qlung * Cvenous
351 ; Rate of change in venous blood compartment (mg/h)
352 ddt_Aarterial = Qlung * Clung/klung * BP - Qkidneys * Carterial - Qliver * Carterial - Qmuscle * Carterial - Qfat * Carterial - Qrest * Carterial - Qudder * Carterial ; Rate of change in arterial blood compartment (mg/h)
353 ddt_Akidneys = Qkidneys * (Carterial - Ckidneys/kkidneys * BP) - Qkidneys * ERkidneys * Carterial ; Rate of change in kidneys compartment (mg/h)
354 ddt_Aliver = Qliver * (Carterial - Cliver/kliver * BP) - Qliver * ERLiver * Carterial ; Rate of change in liver compartment (mg/h)
355 ddt_Alung = Qlung * (Cvenous - Clung/klung * BP) ; Rate of change in lung compartment (mg/h)
356 ddt_Amuscle = Qmuscle * (Carterial - Cmuscle/kmuscle * BP) ; Rate of change in muscle compartment (mg/h)
357 ddt_Afat = Qfat * (Carterial - Cfat/kfat * BP) ; Rate of change in fat compartment (mg/h)
358 ddt_Arest = Qrest * (Carterial - Crest/krest * BP) ; Rate of change in lumping compartment (mg/h)
359 ddt_AEW = Qudder * Carterial - Qudder * CuEW/fuEW * 1/KEWB + CLdiffsin * (CuIW/X - CuEW/Y) - CLinfluxsin * CuEW + CLeffluxsin * CuIW ; Rate of change in extracellular water of udder sub-compartment (mg/h)
360 ddt_AIW = CLdiffsin * (CuEW/Y - CuIW/X) + CLinfluxsin * CuEW - CLeffluxsin * CuIW + CLdiffcan * (Cualveoli/Z - CuIW/X) - CLeffluxcan * CuIW + CLinfluxcan * Cualveoli ; Rate of change in intracellular water of udder sub-compartment (mg/h)

```

```

360 ddt_Aalveoli = CLdiffcan * (CuIW/X - Cualveoli/Z) + CLeffluxcan * CuIW - CLinfluxcan * Cualveoli - Qresidual* (Calveoli - Cresidual) - Qcistern * Calveoli ; Rate of change in alveolar space sub-compartment (mg/h)
361 ddt_Aresidual = Qresidual* (Calveoli - Cresidual) ; Rate of change in residual milk sub-compartment (mg/h)
362 ddt_Acistern = Qcistern * Calveoli ; Rate of change in cisternal space sub-compartment (mg/h)
363 ddt_Abile = Qliver * ERliver * Carterial ; Rate of change in bile (mg/h)
364 ddt_Aurines = Qkidneys * ERkidneys * Carterial ; Rate of change in urines (mg/h)
365 ddt_Aexcretee = CLdiffcan * (CuIW/X - Cualveoli/Z) + CLeffluxcan * CuIW - CLinfluxcan * Cualveoli ; Rate of change in total milk excreted (mg/h)
366 ;-----Supplementary calculations-----;
367 ddt_AUCvenousp = Cvenousp ; AUC in venous plasma (h.mg/L)
368 ddt_AUCmilkT = CmilkT ; AUC in milk produced (h.mg/L)
369 ddt_AUCEW = CEW ; AUC in extracellular water of udder (h.mg/L)
370 ddt_AUCIW = CIW ; AUC in intracellular water of udder (h.mg/L)
371 ddt_AUCvenousp = Cvenousp ; AUC in free venous plasma (h.mg/L)
372 ddt_AUCmilkT = CumilkT ; AUC in free milk produced (h.mg/L)
373 ddt_AUCuEW = CuEW ; AUC in free extracellular water (h.mg/L)
374 ddt_AUCuIW = CuIW ; AUC in free intracellular water (h.mg/L)
375 ddt_AUCexcretee = Cexcretee ; AUC in total milk excreted (h.mg/L)
376 pourcentage=Aexcretee/(10*BW) ; Percentage of the dose excreted in milk
377 CLmilk = Aexcretee/(AUCvenousp+0.000001) ; Milk Clearance (L/h)
378 MP = AUCmilkT / AUCvenousp ; Milk to plasma ratio
379 kpudder= ((AIW+AEW)/Vudder)/Cvenous ; Partition coefficient between udder and plasma
380 ; =====
381 ; ----- Mass balance check ----- ;;
382 ; =====
383 WT = (Vudder + Varterial + Vvenous + Vlung + Vmuscle + Vkidneys + Vliver)* dnonfat + Vfat * dfat + Vrest * drest ; Total body weight (kg)
384 Qtotal = Qrest + Qudder + Qmuscle + Qfat + Qkidneys + Qliver ; Total cardiac output (L/h)
385 Molecule = Adepot + Avenous + Aarterial + Alung + Akidneys + Arest + Aliver + AEW + AIW + Aexcretee + Amuscle + Afat + Abile + Aurines ; Total amount of absorbed drug (mg)
386 ; =====
387 ; ----- Outputs ----- ;;
388 ; =====
389 ;Lower limit
390 CvenousSAT = max(1e-6,Cvenous) ; Venous blood (mg/L)
391 CvenouspSAT = max(1e-6,Cvenousp) ; Venous plasma (mg/L)
392 CarterialSAT= max(1e-6,Carterial) ; Arterial blood (mg/L)
393 ClungSAT = max(1e-6,Clung) ; Lung (mg/L)
394 CkidneysSAT = max(1e-6,Ckidneys) ; Kidneys (mg/L)
395 CliverSAT = max(1e-6,Cliver) ; Liver (mg/L)
396 CrestSAT= max(1e-6,Crest) ; Lumping compartment (mg/L)
397 CmuscleSAT=max(1e-6,Cmuscle) ; Muscle (mg/L)
398 CfatSAT=max(1e-6,Cfat) ; Fat (mg/L)
399 CEWSAT = max(1e-6,CEW) ; Extracellular water of udder (mg/L)
400 CIWSAT = max(1e-6,CIW) ; Intracellular water of udder (mg/L)
401 CalveoliSAT = max(1e-6,Calveoli) ; Alveolar milk (mg/L)
402 CresidualSAT = max(1e-6,Cresidual) ; Residual milk (mg/L)
403 CcisternSAT = max(1e-6,Ccistern) ; Cisternal milk (mg/L)
404 CmilkTtotSAT=max(1e-6,CmilkTtot) ; Total milk contains in the udder (mg/L)
405 CmilkTSAT=max(1e-6,CmilkT) ; Produced milk (mg/L)
406 ; PBPK output

```

```
407 OUTPUT:
408 output={CvenouspSAT,CmilkTSAT}
```

Supplementary References

- Achenbach, 1998. Development of a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for oxytetracycline in cattle. *Toxicological Sciences*.
- Alberghina, D., Casella, S., Vazzana, I., Ferrantelli, V., Giannetto, C., Piccione, G., 2010. Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (*Capra hircus*) using agarose gel electrophoresis. *Vet Clin Pathol* 39, 317–321. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00226.x>
- Balthazar, C.F., Pimentel, T.C., Ferrão, L.L., Almada, C.N., Santillo, A., Albenzio, M., Mollakhalili, N., Mortazavian, A.M., Nascimento, J.S., Silva, M.C., Freitas, M.Q., Sant'Ana, A.S., Granato, D., Cruz, A.G., 2017. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16, 247–262. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250>
- Bobbo, T., Fiore, E., Giancesella, M., Morgante, M., Gallo, L., Ruegg, P.L., Bittante, G., Cecchinato, A., 2017. Variation in blood serum proteins and association with somatic cell count in dairy cattle from multi-breed herds. *Animal* 11, 2309–2319. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001227>
- Brown, R.P., Delp, M.D., Lindstedt, S.L., Rhomberg, L.R., Beliles, R.P., 1997. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health* 13, 407–484. <https://doi.org/10.1177/074823379701300401>
- Carlotti, B., Cesaretti, A., Elisei, F., 2012. Complexes of tetracyclines with divalent metal cations investigated by stationary and femtosecond-pulsed techniques. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 823–834. <https://doi.org/10.1039/C1CP22703C>
- Chi, Z., Liu, R., Teng, Y., Fang, X., Gao, C., 2010. Binding of oxytetracycline to bovine serum albumin: spectroscopic and molecular modeling investigations. *J Agric Food Chem* 58, 10262–10269. <https://doi.org/10.1021/jf101417w>
- Craigmill, A.L., 2003. A physiologically based pharmacokinetic model for oxytetracycline residues in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26, 55–63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2003.00451.x>
- Jackson, P.G., Cockcroft, P.D., 2002. *Clinical Examination of Farm Animals*. Blackwell Science.
- Jamei, M., Bajot, F., Neuhoﬀ, S., Barter, Z., Yang, J., Rostami-Hodjegan, A., Rowland-Yeo, K., 2014. A Mechanistic Framework for In Vitro–In Vivo Extrapolation of Liver Membrane Transporters: Prediction of Drug–Drug Interaction Between Rosuvastatin and Cyclosporine. *Clin Pharmacokinet* 53, 73–87. <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0097-y>

- Ji, S.K., Zhang, F., Sun, Y., Deng, K., Wang, B., Tu, Y., Zhang, N.F., Jiang, C.G., Wang, S., Diao, Q.-Y., 2017. Influence of dietary slow-release urea on growth performance, organ development and serum biochemical parameters of mutton sheep. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. <https://doi.org/10.1111/jpn.12532>
- Larson, B., 1978. *The Mammary Gland/Human Lactation/Milk Synthesis*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-11043-4>
- Lautz, L.S., Dorne, J.L.C.M., Oldenkamp, R., Hendriks, A.J., Ragas, A.M.J., 2020. Generic physiologically based kinetic modelling for farm animals: Part I. Data collection of physiological parameters in swine, cattle and sheep. *Toxicology Letters* 319, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.10.021>
- Leavens, T.L., 2012. Development of a physiologically based pharmacokinetic model to predict tulathromycin distribution in goats - LEAVENS - 2012 - *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2885.2011.01304.x> (accessed 1.9.19).
- Li, M., Gehring, R., Riviere, J.E., Lin, Z., 2018. Probabilistic Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Penicillin G in Milk From Dairy Cows Following Intramammary or Intramuscular Administrations. *Toxicological Sciences* 164, 85–100. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy067>
- Li, M., Wang, Y.-S., Elwell-Cuddy, T., Baynes, R.E., Tell, L.A., Davis, J.L., Maunsell, F.P., Riviere, J.E., Lin, Z., 2020. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models in food-producing animals. Part III: Sheep and goat. *J Vet Pharmacol Ther*. <https://doi.org/10.1111/jvp.12938>
- Lin, Z., Gehring, R., Mochel, J.P., Lavé, T., Riviere, J.E., 2016. Mathematical modeling and simulation in animal health - Part II: principles, methods, applications, and value of physiologically based pharmacokinetic modeling in veterinary medicine and food safety assessment. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 39, 421–438. <https://doi.org/10.1111/jvp.12311>
- Lin, Z., Li, M., Wang, Y.-S., Tell, L.A., Baynes, R.E., Davis, J.L., Vickroy, T.W., Riviere, J.E., 2020. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models in food-producing animals. Part I: Cattle and swine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* n/a. <https://doi.org/10.1111/jvp.12861>
- Lupton, S.J., Shappell, N.W., Shelver, W.L., Hakk, H., 2018. Distribution of Spiked Drugs between Milk Fat, Skim Milk, Whey, Curd, and Milk Protein Fractions: Expansion of Partitioning Models. *J. Agric. Food Chem.* 66, 306–314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04463>
- Maltz, E., Blatchford, D.R., Peaker, M., 1984. Effects of Frequent Milking on Milk Secretion and Mammary Blood Flow in the Goat. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 69, 127–132. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1984.sp002773>

- Martens, H., Stumpff, F., 2019. Assessment of magnesium intake according to requirement in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 103, 1023–1029. <https://doi.org/10.1111/jpn.13106>
- Martin, S.R., 1979. Equilibrium and kinetic studies on the interaction of tetracyclines with calcium and magnesium. *Biophysical Chemistry* 10, 319–326. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(79\)85019-X](https://doi.org/10.1016/0301-4622(79)85019-X)
- McCutcheon, S.N., Blair, H.T., Purchas, R.W., 1993. Body composition and organ weights in fleeceweight-selected and control Romney rams. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 36, 445–449. <https://doi.org/10.1080/00288233.1993.10417745>
- Neville, M.C., Watters, C.D., 1983. Secretion of Calcium into Milk: Review. *Journal of Dairy Science* 66, 371–380. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81802-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81802-5)
- Ng, C.A., Hungerbühler, K., 2013. Bioconcentration of Perfluorinated Alkyl Acids: How Important Is Specific Binding? *Environ. Sci. Technol.* 47, 7214–7223. <https://doi.org/10.1021/es400981a>
- Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research, Special Issue: Goat and Sheep Milk* 68, 88–113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>
- Prosser, 1996. Regulation of Blood Flow in the Mammary Microvasculature. *Journal of Dairy Science* 79, 1184–1197. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76472-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76472-X)
- Rodgers, T., Leahy, D., Rowland, M., 2005. Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases. *J Pharm Sci* 94, 1259–1276. <https://doi.org/10.1002/jps.20322>
- Rodgers, T., Rowland, M., 2006. Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions. *J Pharm Sci* 95, 1238–1257. <https://doi.org/10.1002/jps.20502>
- Shappell, N., Shelver, W., Lupton, S., Fanaselle, W., Doren, J., Hakk, H., 2017. Distribution of Animal Drugs among Curd, Whey, and Milk Protein Fractions in Spiked Skim Milk and Whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04258>
- Thompson, G.E., 1980. The distribution of blood flow in the udder of the sheep and changes brought about by cold exposure and lactation. *J Physiol* 302, 379–386.
- Upton, R.N., 2008. Organ weights and blood flows of sheep and pig for physiological pharmacokinetic modelling. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.08.001>
- Vestweber, J.G., Al-Ani, F.K., 1984. Udder edema: biochemical studies in Holstein cattle. *Cornell Vet* 74, 366–372.

- Williams, P., Kurlak, L., Perkins, A., Budge, H., Stephenson, T., Keisler, D., Symonds, M., Gardner, D., 2007. Hypertension and impaired renal function accompany juvenile obesity: The effect of prenatal diet. *Kidney international* 72, 279–89. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002276>
- Ziv, G., Sulman, F.G., 1972. Binding of Antibiotics to Bovine and Ovine Serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2, 206–213. <https://doi.org/10.1128/AAC.2.3.206>

Références

- Abduljalil, K. *et al.* (2021) 'Prediction of drug concentrations in milk during breastfeeding, integrating predictive algorithms within a physiologically-based pharmacokinetic model', *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, n/a(n/a). doi:10.1002/psp4.12662.
- Abraham, M.H., Gil-Lostes, J. and Fatemi, M. (2009) 'Prediction of milk/plasma concentration ratios of drugs and environmental pollutants', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(6), pp. 2452–2458. doi:10.1016/j.ejmech.2009.01.009.
- Achenbach (1998) 'Development of a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for oxytetracycline in cattle', *Toxicological Sciences* [Preprint]. Available at: <https://odebuplus.univ-poitiers.fr> (Accessed: 20 July 2021).
- Agatonovic-Kustrin, S. *et al.* (2002) 'Molecular descriptors that influence the amount of drugs transfer into human breast milk', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(1), pp. 103–119. doi:10.1016/S0731-7085(02)00037-7.
- Akers, R. and Capuco, A. (2011) 'Lactogenesis', *Encyclopedia of Dairy Science*. Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., editors. Sandiego, CA: Academic Press. Available at: <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=231616> (Accessed: 31 August 2021).
- Akers, R.M., Capuco, A.V. and Keys, J.E. (2006) 'Mammary histology and alveolar cell differentiation during late gestation and early lactation in mammary tissue of beef and dairy heifers', *Livestock Science*, 105(1), pp. 44–49. doi:10.1016/j.livsci.2006.04.026.
- Al-Bataineh, M.M. *et al.* (2009) 'Cultured mammary epithelial monolayers (BME-UV) express functional organic anion and cation transporters', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(5), pp. 422–428. doi:10.1111/j.1365-2885.2009.01057.x.
- Al-Bataineh, M.M. *et al.* (2012) 'Molecular and functional identification of organic anion transporter isoforms in cultured bovine mammary epithelial cells (BME-UV)', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(3), pp. 209–215. doi:10.1111/j.1365-2885.2011.01309.x.
- Alcorn, J. *et al.* (2002) 'Transporter gene expression in lactating and nonlactating human mammary epithelial cells using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(2), pp. 487–496. doi:10.1124/jpet.102.038315.
- Anderson, G.D. (2006) 'Using pharmacokinetics to predict the effects of pregnancy and maternal–infant transfer of drugs during lactation', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(6), pp. 947–960. doi:10.1517/17425255.2.6.947.
- Anderson, P.O. and Sauberman, J.B. (2016) 'Modeling drug passage into human milk', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 100(1), pp. 42–52. doi:10.1002/cpt.377.

- Andersson, M. *et al.* (2013) 'Maternal Transfer of the Cyanobacterial Neurotoxin β -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) via Milk to Suckling Offspring', *PLOS ONE*, 8(10), p. e78133. doi:10.1371/journal.pone.0078133.
- Armand, S. (2015) 'Analyse des différentes approches de validation de méthodes de dosage et proposition d'un guide de validation de méthode de dosage en pharmacie hospitalière', p. 110.
- Atkinson, H.C. and Begg, E.J. (1988) 'Prediction of drug concentrations in human skim milk from plasma protein binding and acid-base characteristics.', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 25(4), pp. 495–503.
- Atkinson, U.C. and Begg, E.J. (1990) 'Prediction of Drug Distribution into Human Milk from Physicochemical Characteristics', *Clinical Pharmacokinetics*, 18(2), pp. 151–167. doi:10.2165/00003088-199018020-00005.
- Ayadi, M. *et al.* (2003) 'Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows', *The Journal of Dairy Research*, 70(1), pp. 1–7. doi:10.1017/s0022029902005873.
- Babu, E. *et al.* (2002) 'Human Organic Anion Transporters Mediate the Transport of Tetracycline', *The Japanese Journal of Pharmacology*, 88(1), pp. 69–76. doi:10.1254/jjp.88.69.
- Ball, K. *et al.* (2012) 'Development of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for the Rat Central Nervous System and Determination of an In Vitro–In Vivo Scaling Methodology for the Blood–Brain Barrier Permeability of Two Transporter Substrates, Morphine and Oxycodone', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(11), pp. 4277–4292. doi:10.1002/jps.23266.
- Ball, R.K. *et al.* (1988) 'Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line.', *The EMBO Journal*, 7(7), pp. 2089–2095.
- Balthazar, C.F. *et al.* (2017) 'Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), pp. 247–262. doi:10.1111/1541-4337.12250.
- Begg, E.J. and Atkinson, H.C. (1993) 'Modelling of the passage of drugs into milk', *Pharmacology & Therapeutics*, 59(3), pp. 301–310. doi:10.1016/0163-7258(93)90072-l.
- Berezhkovskiy, L.M. (2004) 'Volume of distribution at steady state for a linear pharmacokinetic system with peripheral elimination', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(6), pp. 1628–1640. doi:10.1002/jps.20073.
- Bianca, O. *et al.* (2017) 'Olanzapine transfer into sheep's milk. An animal model', *Farmacia*, 65.
- Bird, A.E. and Marshall, A.C. (1967) 'Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients', *Biochemical Pharmacology*, 16(12), pp. 2275–2290. doi:10.1016/0006-2952(67)90215-8.
- Bird, I.M. (1989) 'High performance liquid chromatography: principles and clinical applications', *BMJ (Clinical research ed.)*, 299(6702), pp. 783–787. doi:10.1136/bmj.299.6702.783.

- Blum, F. (2014) 'High performance liquid chromatography', *British Journal of Hospital Medicine* (London, England: 2005), 75(2), pp. C18-21. doi:10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18.
- Bois, F.Y., Jamei, M. and Clewell, H.J. (2010) 'PBPK modelling of inter-individual variability in the pharmacokinetics of environmental chemicals', *Toxicology*, 278(3), pp. 256–267. doi:10.1016/j.tox.2010.06.007.
- Boulanger, B. *et al.* (2003) 'Validation des procédures analytiques quantitatives Harmonisation des démarches', 13, p. 38.
- Boxenbaum, H. (1980) 'Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin', *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 8(2), pp. 165–176. doi:10.1007/bf01065191.
- Brown, R.P. *et al.* (1997) 'Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models', *Toxicology and Industrial Health*, 13(4), pp. 407–484. doi:10.1177/074823379701300401.
- Campbell, J.R. and Marshall, R.T. (2016) *Dairy Production and Processing: The Science of Milk and Milk Products*. Waveland Press.
- Camps, M. *et al.* (1994) 'High and polarized expression of GLUT1 glucose transporters in epithelial cells from mammary gland: acute down-regulation of GLUT1 carriers by weaning', *Endocrinology*, 134(2), pp. 924–934. doi:10.1210/endo.134.2.8299587.
- Cao, Y. and Jusko, W.J. (2012) 'Applications of minimal physiologically-based pharmacokinetic models', *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 39(6), pp. 711–723. doi:10.1007/s10928-012-9280-2.
- Castillo, V. *et al.* (2008) 'Changes in alveolar and cisternal compartments induced by milking interval in the udder of dairy ewes', *Journal of Dairy Science*, 91(9), pp. 3403–3411. doi:10.3168/jds.2008-1097.
- Chen, X. *et al.* (2008) 'A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model', *Pharmaceutical Research*, 25(7), pp. 1511–1520. doi:10.1007/s11095-007-9517-8.
- Chevance (2017) *The present and future of withdrawal period calculations for milk in the European Union: focus on heterogeneous, nonmonotonic data - Chevance - 2017 - Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics - Wiley Online Library*. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvp.12351> (Accessed: 8 November 2019).
- Chillistone, S. and Hardman, J.G. (2014) 'Factors affecting drug absorption and distribution', *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 15(7), pp. 309–313. doi:10.1016/j.mpaic.2014.04.004.
- Clewell, R.A. and Clewell, H.J. (2008) 'Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(1), pp. 129–143. doi:10.1016/j.yrtph.2007.10.012.
- Cosgrove, D. *et al.* (2001) 'Quantification of blood flow', *European Radiology*, 11(8), pp. 1338–1344. doi:10.1007/s003300100985.

- Craigmill, A.L. (2003) 'A physiologically based pharmacokinetic model for oxytetracycline residues in sheep', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26(1), pp. 55–63. doi:10.1046/j.1365-2885.2003.00451.x.
- Davis, S.R. *et al.* (1998) 'Partitioning of milk accumulation between cisternal and alveolar compartments of the bovine udder: relationship to production loss during once daily milking', *The Journal of Dairy Research*, 65(1), pp. 1–8. doi:10.1017/s0022029997002562.
- Davis, S.R., Farr, V.C. and Stelwagen, K. (1999) 'Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review', *Livestock Production Science*, 59(1), pp. 77–94. doi:10.1016/S0301-6226(98)00204-8.
- Derks, H.J.G.M. *et al.* (1994) 'Pharmacokinetic modeling of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and furans (PCDFs) in cows', *Chemosphere*, 28(4), pp. 711–715. doi:10.1016/0045-6535(94)90222-4.
- Dorne, J.L.C.M. and Fink-Gremmels, J. (2013) 'Human and animal health risk assessments of chemicals in the food chain: Comparative aspects and future perspectives', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270(3), pp. 187–195. doi:10.1016/j.taap.2012.03.013.
- Ehinger, A.M. and Kietzmann, M. (2000a) 'Tissue distribution of benzylpenicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23(5), pp. 303–310. doi:10.1111/j.1365-2885.2000.00274.x.
- Ehinger, A.M. and Kietzmann, M. (2000b) 'Tissue Distribution of Oxacillin and Ampicillin in the Isolated Perfused Bovine Udder', *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 47(3), pp. 157–168. doi:10.1046/j.1439-0442.2000.00272.x.
- EMA (2016) 'Guideline on safety and residue data requirements for pharmaceutical veterinary medicinal products intended for minor use or minor species (MUMS)/limited market', p. 26.
- EMA (2018) *Reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation*, European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/reporting-physiologically-based-pharmacokinetic-pbpbk-modelling-simulation> (Accessed: 26 October 2021).
- Evers, J.M. (2004) 'The milkfat globule membrane—compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell', *International Dairy Journal*, 14(8), pp. 661–674. doi:10.1016/j.idairyj.2004.01.005.
- Fatemi, M.H. and Ghorbanzad'e, M. (2010) 'Classification of drugs according to their milk/plasma concentration ratio', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(11), pp. 5051–5055. doi:10.1016/j.ejmech.2010.08.013.
- Feinberg, M. (2007) 'Validation of analytical methods based on accuracy profiles. J Chromatogr A 1158: 174-183', *Journal of chromatography. A*, 1158, pp. 174–83. doi:10.1016/j.chroma.2007.02.021.
- Fleishaker, J.C. (2003) 'Models and methods for predicting drug transfer into human milk', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(5), pp. 643–652. doi:10.1016/S0169-409X(03)00032-2.

- García-Lino, A.M. *et al.* (2019) 'Transporters in the Mammary Gland-Contribution to Presence of Nutrients and Drugs into Milk', *Nutrients*, 11(10). doi:10.3390/nu11102372.
- Gaudin, V. (2016) 'Caractérisation de la performance et validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires', p. 262.
- Gehring, R. and Smith, G.W. (2006) 'An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(4), pp. 237–241. doi:10.1111/j.1365-2885.2006.00750.x.
- Gilchrist, S.E. and Alcorn, J. (2010) 'Lactation stage-dependent expression of transporters in rat whole mammary gland and primary mammary epithelial organoids', *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 24(2), pp. 205–214. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00760.x.
- Gips, M. and Soback, S. (1999) 'Norfloxacin pharmacokinetics in lactating cows with sub-clinical and clinical mastitis', *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 22(3), pp. 202–208. doi:10.1046/j.1365-2885.1999.00210.x.
- González-Lobato, L. *et al.* (2014) 'Novel in vitro systems for prediction of veterinary drug residues in ovine milk and dairy products', *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 31(6), pp. 1026–1037. doi:10.1080/19440049.2014.908261.
- Graham, H. *et al.* (2012) 'Comparison of in-vivo and in-silico methods used for prediction of tissue: plasma partition coefficients in rat', *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64(3), pp. 383–396. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01429.x.
- Grech, A. *et al.* (2019) 'Generic physiologically-based toxicokinetic modelling for fish: Integration of environmental factors and species variability', *Science of The Total Environment*, 651, pp. 516–531. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.163.
- Groneberg, D.A. *et al.* (2002) 'Peptide transport in the mammary gland: expression and distribution of PEPT2 mRNA and protein', *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 282(5), pp. E1172–1179. doi:10.1152/ajpendo.00381.2001.
- Guth, M. (2016) 'Determinants of milk production in FADN dairy farms in the regions of the European Union with predominance of intensive production in 2011', *Management*, 20(2), pp. 473–486. doi:10.1515/manment-2015-0076.
- Gutierrez, K. *et al.* (2015) 'Efficacy of the porcine species in biomedical research', *Frontiers in Genetics*, 6, p. 293. doi:10.3389/fgene.2015.00293.
- Henri, J. *et al.* (2017) 'The present and future of withdrawal period calculations for milk in the European Union: dealing with data below the limit of quantification', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40(2), pp. 116–122. doi:10.1111/jvp.12343.
- Herve, L. *et al.* (2018) 'Oxytocin Induces Mammary Epithelium Disruption and Could Stimulate Epithelial Cell Exfoliation', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 23(3), pp. 139–147. doi:10.1007/s10911-018-9400-8.

- Hodošček, L. *et al.* (2008) 'Linearity of eprinomectin pharmacokinetics in lactating dairy sheep following pour-on administration: Excretion in milk and exposure of suckling lambs', *Veterinary Parasitology*, 154(1), pp. 129–136. doi:10.1016/j.vetpar.2008.02.032.
- Holt, K. *et al.* (2019) 'Prediction of Tissue-Plasma Partition Coefficients Using Microsomal Partitioning: Incorporation into Physiologically based Pharmacokinetic Models and Steady-State Volume of Distribution Predictions', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 47(10), pp. 1050–1060. doi:10.1124/dmd.119.087973.
- Houston, J.B. (1994) 'Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance', *Biochemical Pharmacology*, 47(9), pp. 1469–1479. doi:10.1016/0006-2952(94)90520-7.
- Hubert, Ph. *et al.* (2004) 'Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part I', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(3), pp. 579–586. doi:10.1016/j.jpba.2004.07.027.
- Hubert, Ph. *et al.* (2007) 'Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(1), pp. 70–81. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.013.
- Ito, S. and Alcorn, J. (2003) 'Xenobiotic transporter expression and function in the human mammary gland', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(5), pp. 653–665.
- Jamei, M. *et al.* (2014) 'A Mechanistic Framework for In Vitro–In Vivo Extrapolation of Liver Membrane Transporters: Prediction of Drug–Drug Interaction Between Rosuvastatin and Cyclosporine', *Clinical Pharmacokinetics*, 53(1), pp. 73–87. doi:10.1007/s40262-013-0097-y.
- Jarrett, A.M. *et al.* (2016) 'Sensitivity Analysis of a Pharmacokinetic Model of Vaginal Anti-HIV Microbicide Drug Delivery', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(5), pp. 1772–1778. doi:10.1016/j.xphs.2016.02.015.
- Jones, H. and Rowland-Yeo, K. (2013) 'Basic Concepts in Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Drug Discovery and Development', *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 2(8), p. e63. doi:10.1038/psp.2013.41.
- Jones, H.M., Gardner, I.B. and Watson, K.J. (2009) 'Modelling and PBPK Simulation in Drug Discovery', *The AAPS Journal*, 11(1), pp. 155–166. doi:10.1208/s12248-009-9088-1.
- Jonker, J.W. *et al.* (2005) 'The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk', *Nature Medicine*, 11(2), pp. 127–129. doi:10.1038/nm1186.
- Kang, J.-S. (2012) 'Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples', in Prasain, J. (ed.) *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. InTech. doi:10.5772/32085.
- Katritzky, A.R. *et al.* (2005) 'QSAR treatment of drugs transfer into human breast milk', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(5), pp. 1623–1632. doi:10.1016/j.bmc.2004.12.015.

- Kiehs, K., Hansch, C. and Moore, L. (1966) 'The Role of Hydrophobic Bonding in the Binding of Organic Compounds by Bovine Hemoglobin*', *Biochemistry*, 5(8), pp. 2602–2605. doi:10.1021/bi00872a018.
- Kietzmann, M. *et al.* (1993) 'The isolated perfused bovine udder as an in vitro model of percutaneous drug absorption skin viability and percutaneous absorption of dexamethasone, benzoyl peroxide, and etofenamate', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 30(2), pp. 75–84. doi:10.1016/1056-8719(93)90010-C.
- Kimura, S. *et al.* (2006) 'Development of a human mammary epithelial cell culture model for evaluation of drug transfer into milk', *Archives of Pharmacal Research*, 29(5), pp. 424–429. doi:10.1007/BF02968594.
- Knight, C.H., Hirst, D. and Dewhurst, R.J. (1994) 'Milk accumulation and distribution in the bovine udder during the interval between milkings', *Journal of Dairy Research*, 61(2), pp. 167–177. doi:10.1017/S0022029900028181.
- Komprda, J. *et al.* (2019) 'Dynamics of PCB exposure in the past 50 years and recent high concentrations in human breast milk: Analysis of influencing factors using a physiologically based pharmacokinetic model', *The Science of the Total Environment*, 690, pp. 388–399. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.504.
- Koshimichi, H. *et al.* (2011) 'Analysis and prediction of drug transfer into human milk taking into consideration secretion and reuptake clearances across the mammary epithelia', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 39(12), pp. 2370–2380. doi:10.1124/dmd.111.040972.
- van der Laan, J.W. *et al.* (2010) 'Regulatory acceptability of the minipig in the development of pharmaceuticals, chemicals and other products', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62(3), pp. 184–195. doi:10.1016/j.vascn.2010.05.005.
- Larson, B. (1978) *The Mammary Gland/Human Lactation/Milk Synthesis*. Elsevier. doi:10.1016/C2013-0-11043-4.
- Laurentie, M., Creff-Froger, C. and Gaudin, V. (2002) 'Surveillance des résidus d'antibiotiques. Apport des méthodes de spectrométrie de masse à l'identification des contaminants', *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 155, p. 283. doi:10.4267/2042/61544.
- Lautz, L.S. *et al.* (2019) 'Physiologically based kinetic models for farm animals: Critical review of published models and future perspectives for their use in chemical risk assessment', *Toxicology in Vitro*, 60, pp. 61–70. doi:10.1016/j.tiv.2019.05.002.
- Lautz, L.S., Nebbia, C., *et al.* (2020) 'An open source physiologically based kinetic model for the chicken (*Gallus gallus domesticus*): Calibration and validation for the prediction residues in tissues and eggs', *Environment International*, 136, p. 105488. doi:10.1016/j.envint.2020.105488.
- Lautz, L.S., Dorne, J.L.C.M., *et al.* (2020) 'Generic physiologically based kinetic modelling for farm animals: Part I. Data collection of physiological parameters in swine, cattle and sheep', *Toxicology Letters*, 319, pp. 95–101. doi:10.1016/j.toxlet.2019.10.021.

- Leavens, T.L. (2012) *Development of a physiologically based pharmacokinetic model to predict tulathromycin distribution in goats - LEAVENS - 2012 - Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics - Wiley Online Library*. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2885.2011.01304.x> (Accessed: 9 January 2019).
- Leavens, T.L. *et al.* (2014) 'Development of a physiologically based pharmacokinetic model for flunixin in cattle (*Bos taurus*)', *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(9), pp. 1506–1521. doi:10.1080/19440049.2014.938363.
- Li, M. *et al.* (2017) 'Development and application of a population physiologically based pharmacokinetic model for penicillin G in swine and cattle for food safety assessment', *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 107(Pt A), pp. 74–87. doi:10.1016/j.fct.2017.06.023.
- Li, M. *et al.* (2018) 'Probabilistic Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Penicillin G in Milk From Dairy Cows Following Intramammary or Intramuscular Administrations', *Toxicological Sciences*, 164(1), pp. 85–100. doi:10.1093/toxsci/kfy067.
- Li, M. *et al.* (2019) 'Integration of Food Animal Residue Avoidance Databank (FARAD) empirical methods for drug withdrawal interval determination with a mechanistic population-based interactive physiologically based pharmacokinetic (iPBPK) modeling platform: example for flunixin meglumine administration', *Archives of Toxicology* [Preprint]. doi:10.1007/s00204-019-02464-z.
- Li, M. *et al.* (2020) 'Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models in food-producing animals. Part III: Sheep and goat', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [Preprint]. doi:10.1111/jvp.12938.
- Lin, Z. *et al.* (2016) 'Mathematical modeling and simulation in animal health - Part II: principles, methods, applications, and value of physiologically based pharmacokinetic modeling in veterinary medicine and food safety assessment', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39(5), pp. 421–438. doi:10.1111/jvp.12311.
- Lindner, S. *et al.* (2013) 'Expression and subcellular localization of efflux transporter ABCG2/BCRP in important tissue barriers of lactating dairy cows, sheep and goats', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(6), pp. 562–570.
- Ling, B. and Alcorn, J. (2008) 'Acute Administration of Cefepime Lowers L-Carnitine Concentrations in Early Lactation Stage Rat Milk', *The Journal of Nutrition*, 138(7), pp. 1317–1322. doi:10.1093/jn/138.7.1317.
- Linn, J.G. (1988) *Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows, Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*. National Academies Press (US). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218193/> (Accessed: 3 September 2021).
- Liu, D. *et al.* (2020) 'Considerations and Caveats when Applying Global Sensitivity Analysis Methods to Physiologically Based Pharmacokinetic Models', *The AAPS Journal*, 22(5), p. 93. doi:10.1208/s12248-020-00480-x.

- Loccisano, A.E. *et al.* (2013) 'Development of PBPK models for PFOA and PFOS for human pregnancy and lactation life stages', *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 76(1), pp. 25–57. doi:10.1080/15287394.2012.722523.
- Lorenzutti, A.M. *et al.* (2017) 'Pharmacokinetics, milk penetration and PK/PD analysis by Monte Carlo simulation of marbofloxacin, after intravenous and intramuscular administration to lactating goats', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40(6), pp. 629–640. doi:10.1111/jvp.12409.
- Luckner, P. and Brandsch, M. (2005) 'Interaction of 31 β -lactam antibiotics with the H⁺/peptide symporter PEPT2: Analysis of affinity constants and comparison with PEPT1', *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 59, pp. 17–24. doi:10.1016/j.ejpb.2004.07.008.
- Lupton, S.J. *et al.* (2018) 'Distribution of Spiked Drugs between Milk Fat, Skim Milk, Whey, Curd, and Milk Protein Fractions: Expansion of Partitioning Models', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(1), pp. 306–314. doi:10.1021/acs.jafc.7b04463.
- MacLachlan, D. (2010) 'Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for residues of lipophilic pesticides in poultry', *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 27, pp. 302–14. doi:10.1080/19440040903296683.
- MacLachlan, D.J. (2009) *Influence of physiological status on residues of lipophilic xenobiotics in livestock*. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680941> (Accessed: 9 January 2019).
- Mahmood, I. (2007) 'Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(11), pp. 1177–1192. doi:10.1016/j.addr.2007.05.015.
- Mahnke, H. *et al.* (2016) 'The ABCG2 Efflux Transporter in the Mammary Gland Mediates Veterinary Drug Secretion across the Blood-Milk Barrier into Milk of Dairy Cows', *Drug Metabolism and Disposition*, 44(5), pp. 700–708. doi:10.1124/dmd.115.068940.
- Mather, I. and Keenan, T. (1998) 'Origin and Secretion of Milk Lipids', *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 3, pp. 259–73. doi:10.1023/A:1018711410270.
- McManaman, J.L. and Neville, M.C. (2003) 'Mammary physiology and milk secretion', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(5), pp. 629–641.
- McNally, K., Cotton, R. and Loizou, G. (2011) 'A Workflow for Global Sensitivity Analysis of PBPK Models', *Frontiers in Pharmacology*, 2, p. 31. doi:10.3389/fphar.2011.00031.
- McNamara, P.J., Burgio, D. and Yoo, S.D. (1992) 'Pharmacokinetics of cimetidine during lactation: species differences in cimetidine transport into rat and rabbit milk', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 261(3), pp. 918–923.
- Mercer, H.D. *et al.* (1970) 'Milk-out rates for antibiotics in intramammary infusion products used in the treatment of bovine mastitis: relationship of somatic cell counts, milk production level, and drug vehicle.', *American journal of veterinary research* [Preprint].

- Merino, G. *et al.* (2010) 'In Vivo Inhibition of BCRP/ABCG2 Mediated Transport of Nitrofurantoin by the Isoflavones Genistein and Daidzein: A Comparative Study in Bcrp1 $-/-$ Mice', *Pharmaceutical research*, 27, pp. 2098–105. doi:10.1007/s11095-010-0208-5.
- Meskin, M.S. and Lien, E.J. (1985) 'Qsar Analysis of Drug Excretion into Human Breast Milk', *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 10(3), pp. 269–278. doi:10.1111/j.1365-2710.1985.tb00924.x.
- Monks, J. and Neville, M.C. (2004) 'Albumin transcytosis across the epithelium of the lactating mouse mammary gland', *The Journal of Physiology*, 560(1), pp. 267–280.
- Montalbetti, N. *et al.* (2014) 'Nutrient transport in the mammary gland: calcium, trace minerals and water soluble vitamins', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 19(1), pp. 73–90. doi:10.1007/s10911-014-9317-9.
- Mourier, P. and Brun, A. (1998) 'Study of the metabolism of spiramycin in pig liver', *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 704, pp. 197–205. doi:10.1016/S0378-4347(97)00477-5.
- Nauwelaerts, N. *et al.* (2021) 'A comprehensive review on non-clinical methods to study transfer of medication into breast milk – A contribution from the ConcePTION project', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, p. 111038. doi:10.1016/j.biopha.2020.111038.
- Naylor, M. *et al.* (2003) 'Prolactin Regulates Mammary Epithelial Cell Proliferation Via Autocrine/Paracrine Mechanism', *Endocrine*, 20, pp. 111–4. doi:10.1385/ENDO:20:1-2:111.
- Nestorov, I. (2007) 'Whole-body physiologically based pharmacokinetic models', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 3(2), pp. 235–249. doi:10.1517/17425255.3.2.235.
- Neville, M.C. and Watters, C.D. (1983) 'Secretion of Calcium into Milk: Review', *Journal of Dairy Science*, 66(3), pp. 371–380. doi:10.3168/jds.S0022-0302(83)81802-5.
- Nguyen, D.A. and Neville, M.C. (1998) 'Tight junction regulation in the mammary gland', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3(3), pp. 233–246.
- Nickerson (2011) *MAMMARY GLAND | Anatomy, ResearchGate*. Available at: https://www.researchgate.net/publication/291068331_MAMMARY_GLAND_Anatomy (Accessed: 5 December 2018).
- Nikolin, B. *et al.* (2004) 'High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses', *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 4(2), pp. 5–9. doi:10.17305/bjbms.2004.3405.
- Novac, C.S. and Andrei, S. (2020) 'The Impact of Mastitis on the Biochemical Parameters, Oxidative and Nitrosative Stress Markers in Goat's Milk: A Review', *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(11), p. E882. doi:10.3390/pathogens9110882.
- Ogorevc, J. and Zorc, M. (2018) 'Development of an In Vitro Goat Mammary Gland Model: Establishment, Characterization, and Applications of Primary Goat Mammary Cell Cultures', in. doi:10.5772/intechopen.71853.

- Ontsouka (2014) *Cholesterol Transport and Regulation in the Mammary Gland*, ResearchGate. Available at: https://www.researchgate.net/publication/260131181_Cholesterol_Transport_and_Regulation_in_the_Mammary_Gland (Accessed: 19 December 2018).
- Oskarsson, A. *et al.* (2017) 'Short communication: Staphylococcus aureus infection modulates expression of drug transporters and inflammatory biomarkers in mouse mammary gland', *Journal of Dairy Science*, 100(3), pp. 2375–2380. doi:10.3168/jds.2016-11650.
- Ozdemir, Z. (2018) 'Behaviours of Drugs in the Milk -A Review', *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.* [Preprint]. Available at: https://www.academia.edu/38701395/Behaviours_of_Drugs_in_the_Milk_-A_Review (Accessed: 8 January 2020).
- Ozdemir, Z. *et al.* (2018) 'Determination of milk/plasma ratio and milk and plasma pharmacokinetics of amoxicillin after intramuscular administration in lactating cows', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [Preprint]. doi:10.1111/jvp.12713.
- Paalzow, L.K. (1995) 'Torsten Teorell, the Father of Pharmacokinetics', *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 100(1), pp. 41–46. doi:10.3109/03009739509178895.
- Park, Y.W. *et al.* (2007) 'Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk', *Small Ruminant Research*, 68(1), pp. 88–113. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.013.
- Perez, M. *et al.* (2013) 'Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep', *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 196(2), pp. 203–208. doi:10.1016/j.tvjl.2012.09.012.
- Peters, S.A. (2012) 'Physiologically-Based Modeling', in *Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 13–16. doi:10.1002/9781118140291.ch2.
- Pinto, I.S.B. *et al.* (2017) 'SHORT-COMMUNICATION Evaluation of perfused bovine udder for gene expression studies in dairy cows', *Genetics and Molecular Research*, 16(1). doi:10.4238/gmr16019637.
- Poulin, P. (2001) *Prediction of adipose tissue: plasma partition coefficients for structurally unrelated drugs*. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170034> (Accessed: 27 February 2020).
- Poulin, P. and Theil, F.P. (2000) 'A priori prediction of tissue:plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(1), pp. 16–35. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<16::AID-JPS3>3.0.CO;2-E.
- Poulin, P. and Theil, F.-P. (2002) 'Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(5), pp. 1358–1370. doi:10.1002/jps.10128.
- Price, P.S. *et al.* (2003) 'Modeling interindividual variation in physiological factors used in PBPK models of humans', *Critical Reviews in Toxicology*, 33(5), pp. 469–503.

- Pritsos, C.A. (2000) 'Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system', *Chemico-Biological Interactions*, 129(1), pp. 195–208. doi:10.1016/S0009-2797(00)00203-9.
- Prosser (1996) 'Regulation of Blood Flow in the Mammary Microvasculature', *Journal of Dairy Science*, 79(7), pp. 1184–1197. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76472-X.
- Puggioni, G.M.G. *et al.* (2020) 'Relationship of Late Lactation Milk Somatic Cell Count and Cathelicidin with Intramammary Infection in Small Ruminants', *Pathogens*, 9(1), p. 37. doi:10.3390/pathogens9010037.
- Rainard, P. (2017) 'Mammary microbiota of dairy ruminants: fact or fiction?', *Veterinary Research*, 48(1), p. 25. doi:10.1186/s13567-017-0429-2.
- Rasmussen, F. (1971) 'Excretion of Drugs by Milk', in Brodie, B.B., Gillette, J.R., and Ackerman, H.S. (eds) *Concepts in Biochemical Pharmacology: Part 1*. Berlin, Heidelberg: Springer (Handbuch der experimentellen Pharmakologie/Handbook of Experimental Pharmacology), pp. 390–402. doi:10.1007/978-3-642-65052-9_20.
- Real, R. *et al.* (2011) 'Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34(4), pp. 313–321. doi:10.1111/j.1365-2885.2010.01241.x.
- Redding, L.E. *et al.* (2008) 'Population physiologically based pharmacokinetic modeling for the human lactational transfer of PCB-153 with consideration of worldwide human biomonitoring results', *Environmental Health Perspectives*, 116(12), pp. 1629–1635. doi:10.1289/ehp.11519.
- Renard, L. *et al.* (1996) 'Pharmacokinetic-pharmacodynamic model for spiramycin in staphylococcal mastitis', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19(2), pp. 95–103. doi:10.1111/j.1365-2885.1996.tb00019.x.
- Riad, M.H. *et al.* (2021) 'Development and Application of an interactive Physiologically Based Pharmacokinetic (iPBPK) Model to Predict Oxytetracycline Tissue Distribution and Withdrawal Intervals in Market-Age Sheep and Goats', *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, p. kfab095. doi:10.1093/toxsci/kfab095.
- Robertson, H.T. and Hlastala, M.P. (2007) 'Microsphere maps of regional blood flow and regional ventilation', *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 102(3), pp. 1265–1272. doi:10.1152/japplphysiol.00756.2006.
- Rodgers, T., Leahy, D. and Rowland, M. (2005) 'Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: predicting the tissue distribution of moderate-to-strong bases', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(6), pp. 1259–1276. doi:10.1002/jps.20322.
- Rodgers, T. and Rowland, M. (2006) 'Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(6), pp. 1238–1257. doi:10.1002/jps.20502.

- Rodgers, T. and Rowland, M. (2007) 'Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes', *Pharmaceutical Research*, 24(5), pp. 918–933. doi:10.1007/s11095-006-9210-3.
- Roura, E. *et al.* (2016) 'Critical review evaluating the pig as a model for human nutritional physiology', *Nutrition Research Reviews*, 29(1), pp. 60–90. doi:10.1017/S0954422416000020.
- Rowland, M., Peck, C. and Tucker, G. (2011) 'Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51, pp. 45–73. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100540.
- Rozet, E. *et al.* (2007) 'Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation: Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts', *Analytica Chimica Acta*, 591(2), pp. 239–247. doi:10.1016/j.aca.2007.04.002.
- Ruark, C.D. *et al.* (2014) 'Predicting Passive and Active Tissue:Plasma Partition Coefficients: Interindividual and Interspecies Variability', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(7), pp. 2189–2198. doi:10.1002/jps.24011.
- Rudaz, S. and Feinberg, M. (2018) 'From method validation to result assessment: Established facts and pending questions', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, pp. 68–74. doi:10.1016/j.trac.2018.04.013.
- Rule, R. *et al.* (2001) 'Pharmacokinetics and residues in milk of oxytetra-cyclines administered parenterally to dairy goats', *Australian Veterinary Journal*, 79(7), pp. 492–496. doi:10.1111/j.1751-0813.2001.tb13023.x.
- Salama, A.A.K. *et al.* (2004) 'Changes in Cisternal Udder Compartment Induced by Milking Interval in Dairy Goats Milked Once or Twice Daily', *Journal of Dairy Science*, 87(5), pp. 1181–1187. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73267-1.
- Salman, S. *et al.* (2011) 'Population pharmacokinetic modeling of tramadol and its O-desmethyl metabolite in plasma and breast milk', *European Journal of Clinical Pharmacology*, 67(9), pp. 899–908. doi:10.1007/s00228-011-1023-6.
- Sanders, P. *et al.* (1992) 'Pharmacokinetics of spiramycin after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration in lactating cows', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 15(1), pp. 53–61. doi:10.1111/j.1365-2885.1992.tb00986.x.
- Sanders, P. *et al.* (1994) 'Pharmacokinetics and tissue residues of spiramycin in cattle after intramuscular administration of multiple doses', *American Journal of Veterinary Research*, 55(3), pp. 358–362.
- Schmitt, M.V. *et al.* (2020) 'Extension of the mechanistic tissue distribution model of Rodgers & Rowland by systematic incorporation of lysosomal trapping: impact on K_{pu} and volume of distribution predictions in the rat', *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* [Preprint]. doi:10.1124/dmd.120.000161.

- Schmitt, W. (2008) 'General approach for the calculation of tissue to plasma partition coefficients', *Toxicology in Vitro*, 22(2), pp. 457–467. doi:10.1016/j.tiv.2007.09.010.
- Schneider, M. *et al.* (2004) 'Pharmacokinetics of Marbofloxacin in Lactating Cows After Repeated Intramuscular Administrations and Pharmacodynamics Against Mastitis Isolated Strains', *Journal of Dairy Science*, 87(1), pp. 202–211. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73159-8.
- Schricks, J. and Fink-Gremmels, J. (2007) 'P-glycoprotein-mediated transport of oxytetracycline in the Caco-2 cell model', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(1), pp. 25–31. doi:10.1111/j.1365-2885.2007.00808.x.
- Schricks, J.A. and Fink-Gremmels, J. (2008) 'Implications of ABC transporters on the disposition of typical veterinary medicinal products', *European Journal of Pharmacology*, 585(2), pp. 510–519. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.014.
- Shah, V.P. *et al.* (1992) 'Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(3), pp. 309–312. doi:10.1002/jps.2600810324.
- Shappell, N. *et al.* (2017) 'Distribution of Animal Drugs among Curd, Whey, and Milk Protein Fractions in Spiked Skim Milk and Whey', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65. doi:10.1021/acs.jafc.6b04258.
- Sharma, V. and McNeill, J.H. (2009) 'To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation', *British Journal of Pharmacology*, 157(6), pp. 907–921. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00267.x.
- Shem-Tov, M. *et al.* (1997) 'Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of ewes', *Veterinary Research*, 28(6), pp. 571–579.
- Shem-Tov, M. *et al.* (1998) 'Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 21(3), pp. 209–213. doi:10.1046/j.1365-2885.1998.00137.x.
- Shennan, D. (2008) 'Calcium transport by mammary secretory cells: Mechanisms underlying transepithelial movement', *Cellular and Molecular Biology Letters*, 13(4), pp. 514–525. doi:10.2478/s11658-008-0020-y.
- Shennan, D.B. (1998) 'Mammary gland membrane transport systems', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3(3), pp. 247–258.
- Shennan, D.B. and Peaker, M. (2000) 'Transport of Milk Constituents by the Mammary Gland', *Physiological Reviews*, 80(3), pp. 925–951. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.925.
- Sisodia, C.S. and Stowe, C.M. (1964) 'The mechanism of drug secretion into bovine milk', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 111, pp. 650–661. doi:10.1111/j.1749-6632.1964.tb53133.x.
- Song, F. *et al.* (2017) 'Species Differences in Human and Rodent PEPT2-Mediated Transport of Glycylsarcosine and Cefadroxil in *Pichia Pastoris* Transformants', *Drug Metabolism and Disposition*, 45(2), pp. 130–136. doi:10.1124/dmd.116.073320.

- Stelwagen, K. (2001) 'Effect of Milking Frequency on Mammary Functioning and Shape of the Lactation Curve', *Journal of Dairy Science*, 84, pp. E204–E211. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)70219-6.
- Sugano, K. (2021) 'Lost in modelling and simulation?', *ADMET and DMPK*, 9(2), pp. 75–109. doi:10.5599/admet.923.
- Tanoshima, R. *et al.* (2014) 'Population PK modelling and simulation based on fluoxetine and norfluoxetine concentrations in milk: a milk concentration-based prediction model', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78(4), pp. 918–928. doi:10.1111/bcp.12409.
- Terada, T. *et al.* (1997) 'Recognition of beta-lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, in LLC-PK1 cells', *The American Journal of Physiology*, 273(5 Pt 2), pp. F706–F711.
- Thompson, M. (2011) 'Uncertainty functions, a compact way of summarising or specifying the behaviour of analytical systems', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), pp. 1168–1175. doi:10.1016/j.trac.2011.03.012.
- Tian, X. *et al.* (2007) 'Roles of P-Glycoprotein, Bcrp, and Mrp2 in Biliary Excretion of Spiramycin in Mice', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), pp. 3230–3234. doi:10.1128/AAC.00082-07.
- Tremblay, R.T., Kim, D. and Fisher, J.W. (2012) 'Determination of tissue to blood partition coefficients for nonvolatile herbicides, insecticides, and fungicides using negligible depletion solid-phase microextraction (nd-SPME) and ultrafiltration', *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 75(5), pp. 288–298. doi:10.1080/15287394.2012.652059.
- Tsamandouras, N., Rostami-Hodjegan, A. and Aarons, L. (2015) 'Combining the “bottom up” and “top down” approaches in pharmacokinetic modelling: fitting PBPK models to observed clinical data', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 79(1), pp. 48–55. doi:10.1111/bcp.12234.
- Upton, R., Grant, C. and Ludbrook, G. (1994) 'An Ultrasonic Doppler Venous Outflow Method for the Continuous Measurement of Cerebral Blood Flow in Conscious Sheep', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14, pp. 680–8. doi:10.1038/jcbfm.1994.85.
- Upton, R.N. (2008) 'Organ weights and blood flows of sheep and pig for physiological pharmacokinetic modelling', *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 58(3), pp. 198–205. doi:10.1016/j.vascn.2008.08.001.
- Upton, R.N., Foster, D.J.R. and Abuhelwa, A.Y. (2016) 'An introduction to physiologically-based pharmacokinetic models', *Paediatric Anaesthesia*, 26(11), pp. 1036–1046. doi:10.1111/pan.12995.
- Utsey, K. *et al.* (2020) 'Quantification of the Impact of Partition Coefficient Prediction Methods on Physiologically Based Pharmacokinetic Model Output Using a Standardized Tissue Composition', *Drug Metabolism and Disposition*, 48(10), pp. 903–916. doi:10.1124/dmd.120.090498.
- Ventrella, D. *et al.* (2019) 'Non-clinical Models to Determine Drug Passage into Human Breast Milk', *Current Pharmaceutical Design*, 25(5), pp. 534–548. doi:10.2174/1381612825666190320165904.

- Viel, A. (2018) *A Population WB-PBPK Model of Colistin and its Prodrug CMS in Pigs: Focus on the Renal Distribution and Excretion* | SpringerLink. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11095-018-2379-4> (Accessed: 15 January 2019).
- Virk, S., Kirk, C. and Shears, S. (1985) 'Ca²⁺ transport and Ca²⁺ dependent ATP hydrolysis by Golgi vesicles from lactating rat mammary glands', *The Biochemical journal*, 226, pp. 741–8.
- Virkel, G. et al. (2019) 'Role of ABC Transporters in Veterinary Medicine: Pharmaco- Toxicological Implications', *Current Medicinal Chemistry*, 26(7), pp. 1251–1269. doi:10.2174/0929867325666180201094730.
- Wall, S.K. et al. (2015) 'Blood-derived proteins in milk at start of lactation: Indicators of active or passive transfer', *Journal of Dairy Science*, 98(11), pp. 7748–7756. doi:10.3168/jds.2015-9440.
- Wassermann, L., Halwachs, S., Baumann, D., et al. (2013) 'Assessment of ABCG2-mediated transport of xenobiotics across the blood–milk barrier of dairy animals using a new MDCKII in vitro model', *Archives of Toxicology*, 87(9), pp. 1671–1682. doi:10.1007/s00204-013-1066-9.
- Wassermann, L., Halwachs, S., Lindner, S., et al. (2013) 'Determination of Functional ABCG2 Activity and Assessment of Drug–ABCG2 Interactions in Dairy Animals Using a Novel MDCKII In Vitro Model', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(2), pp. 772–784. doi:10.1002/jps.23399.
- Watanabe, T. et al. (2009) 'Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328(2), pp. 652–662. doi:10.1124/jpet.108.146647.
- Waxman, S. et al. (2001) 'Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in adult goats', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24(6), pp. 375–378.
- Whittem, T. (2012) 'Modelling the concentration–time relationship in milk from cattle administered an intramammary drug', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35(5), pp. 460–471. doi:10.1111/j.1365-2885.2011.01352.x.
- WHO (2010) *Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment*. Edited by Weltgesundheitsorganisation, International Programme on Chemical Safety, and Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Geneva: World Health Organization (Harmonization project document, No. 9).
- Woodward, A.P., Morin, D. and Whittem, T. (2020) 'Population physiologically based modeling of pirlimycin milk concentrations in dairy cows', *Journal of Dairy Science*, 103(11), pp. 10639–10650. doi:10.3168/jds.2020-18760.
- Woodward, A.P. and Whittem, T. (2019) 'Physiologically based modelling of the pharmacokinetics of three beta-lactam antibiotics after intra-mammary administration in dairy cows', *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* [Preprint]. doi:10.1111/jvp.12812.
- Wu, H. et al. (2013) 'Use of population pharmacokinetic modeling and Monte Carlo simulation to capture individual animal variability in the prediction of flunixin withdrawal times in cattle',

- Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(3), pp. 248–257. doi:10.1111/j.1365-2885.2012.01420.x.
- Yagdiran, Y. *et al.* (2016) 'ABC- and SLC-Transporters in Murine and Bovine Mammary Epithelium - Effects of Prochloraz', *PLOS ONE*. Edited by C. Williams, 11(3), p. e0151904. doi:10.1371/journal.pone.0151904.
- Yau, E. *et al.* (2020) 'Global Sensitivity Analysis of the Rodgers and Rowland Model for Prediction of Tissue: Plasma Partitioning Coefficients: Assessment of the Key Physiological and Physicochemical Factors That Determine Small-Molecule Tissue Distribution', *The AAPS Journal*, 22(2), p. 41. doi:10.1208/s12248-020-0418-7.
- Yeung, C.H.T. *et al.* (2021) 'Incorporating Breastfeeding-Related Variability with Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling to Predict Infant Exposure to Maternal Medication Through Breast Milk: a Workflow Applied to Lamotrigine', *The AAPS Journal*, 23(4), p. 70. doi:10.1208/s12248-021-00599-5.
- Zhang, X.-Y. *et al.* (2015) 'Sobol Sensitivity Analysis: A Tool to Guide the Development and Evaluation of Systems Pharmacology Models', *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 4(2), pp. 69–79. doi:10.1002/psp4.6.
- Zhao, S. *et al.* (2007) 'Simultaneous Determination of Trace Levels of 10 Quinolones in Swine, Chicken, and Shrimp Muscle Tissues Using HPLC with Programmable Fluorescence Detection', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), pp. 3829–3834. doi:10.1021/jf0635309.
- Ziv, G. (1974) '[Pharmacokinetic profile of spiramycine in ewes and dairy cows]', *Cahiers de Medecine Veterinaire (France)* [Preprint]. Available at: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=%5BPharmacokinetic+profile+of+spiramycine+in+ewes+and+dairy+cows%5D&author=Ziv%2C+G.&publication_year=1974 (Accessed: 15 October 2021).
- Ziv, G. and Sulman, F.G. (1975) 'Absorption of antibiotics by the bovine udder', *Journal of Dairy Science*, 58(11), pp. 1637–1644. doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84762-X.

Résumé

La lactation permet l'apport de nutriments et de cellules immunitaires essentielles au nouveau-né. Elle entraîne également le passage de xénobiotiques, tels que des médicaments ou des polluants de l'environnement, dans le lait. Bien que le passage des xénobiotiques dans le lait soit connu, aussi bien en médecine humaine (monitoring des femmes allaitantes) qu'en médecine vétérinaire (étude des résidus et du temps d'attente), ce phénomène complexe est peu étudié.

Les travaux de la thèse se sont focalisés sur une étude cinétique comparative d'antibiotiques dans le lait de trois espèces animales de production (vache, chèvre, brebis). Quatre antibiotiques (spiramycine, oxytétracycline, marbofloxacin et amoxicilline) ont été sélectionnés en raison de leurs caractéristiques physico-chimiques et propriétés pharmacocinétiques distinctes, représentant ainsi un panel de différents profils cinétiques dans le lait. L'objectif de la thèse était d'étudier le passage de ces différentes molécules dans le lait de trois espèces animales. Pour répondre à cet objectif, la thèse s'est déroulée en trois grandes étapes :

- (i) La génération de nouvelles données expérimentales. Pour cela, chaque antibiotique a été administré par voie intramusculaire aux trois espèces et des prélèvements sanguins et laitiers individuels ont été réalisés pendant plusieurs jours suivant l'administration.
- (ii) Le développement et la validation de méthodes analytiques spécifiques à chaque antibiotique et chaque matrice (plasma et lait), suivi du dosage des prélèvements. L'utilisation de l'approche globale, basée sur le profil d'exactitude, a été illustrée en prenant l'exemple de la spiramycine. Grâce à cette approche, une seule et unique méthode de dosage a été développée pour le dosage de la spiramycine et de son métabolite actif dans le lait des vaches, chèvres et brebis, permettant ainsi de simplifier et d'accélérer les dosages en routine dans les trois laits.
- (iii) Le développement d'un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie (PBPK) générique pour décrire le passage de molécules dans le lait d'animaux de production. Une revue approfondie de la littérature a permis de regrouper les connaissances sur la physiologie des trois espèces animales, la sécrétion et la composition du lait ainsi que sur les données physico-chimiques et pharmacocinétiques des quatre molécules, nécessaires pour la construction du

modèle. Des expérimentations *in vitro* sur la diffusion des molécules à travers une membrane physiologique ont été réalisées en collaboration avec l'Université d'Utrecht afin de renseigner les paramètres de perméabilité membranaire. Enfin, le modèle PBPK a été appliqué à la cinétique de l'oxytétracycline dans le lait de vache et de chèvre et a permis d'explorer la distribution de l'antibiotique dans la glande mammaire et le lait, son état d'ionisation ainsi que sa fixation aux composants du tissu et du lait et sa répartition entre la matière grasse et la phase aqueuse du lait. Des analyses non compartimentales ont été réalisées sur les trois autres antibiotiques, permettant de comparer leur excrétion dans le lait des trois espèces, en fonction de leur lipophilie, leur ionisation et leurs caractéristiques pharmacocinétiques plasmatiques.

Ainsi, au-delà de l'évaluation du passage de ces quatre antibiotiques dans le lait, ce projet a pour ambition, grâce au modèle PBPK générique, d'aider à prédire la pharmacocinétique des xénobiotiques dans le lait des animaux, voire même des femmes allaitantes.

Mots clefs : modèle PBPK, barrière sang-lait, résidus, antibiotiques, physiologie, pharmacocinétique, bio analyse, profil d'exactitude.

Abstract

Lactation provides essential nutrients and immune cells to the newborn. It also results in the passage of xenobiotics, such as drugs or environmental pollutants, into the milk. Although the passage of xenobiotics in milk is known, both in human medicine (monitoring of nursing mothers) and in veterinary medicine (study of residues and withdrawal time), this complex phenomenon is poorly studied.

The work of the thesis focused on a comparative kinetic study of antibiotics in milk of three production animal species (cow, goat, ewe). Four antibiotics (spiramycin, oxytetracycline, marbofloxacin and amoxicillin) were selected because of their distinct physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties, thus representing a panel of different kinetic profiles in milk. The objective of the thesis was to study the passage of these different molecules in the milk of three animal species. To achieve this objective, the thesis was carried out in three main steps:

- (i) Generation of new experimental data. For this purpose, each antibiotic was administered intramuscularly to the three species and individual blood and milk samples were taken for several days after administration.
- (ii) The development and validation of specific analytical methods for each antibiotic and each matrix (plasma and milk), followed by the determination of the samples. The use of the global approach, based on the accuracy profile, was illustrated by taking the example of spiramycin. Using this approach, a single assay method was developed for the determination of spiramycin and its active metabolite in milk from cows, goats and ewes, thus simplifying and accelerating routine assays in all three milks.
- (iii) The development of a generic physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model to describe the passage of molecules in the milk of production animals. An extensive review of the literature allowed us to collect the knowledge on the physiology of the three animal species, the secretion and composition of milk as well as the physicochemical and pharmacokinetic data of the four molecules, necessary for the construction of the model. *In vitro* experiments on the diffusion of the molecules through a physiological membrane were carried out in collaboration

with the University of Utrecht in order to provide information on the membrane permeability parameters. Finally, the PBPK model was applied to the kinetics of oxytetracycline in cow and goat milk and explored the distribution of the antibiotic in the mammary gland and milk, its ionization state as well as its binding to tissue and milk components and its partitioning between the fat and the water phase of the milk. Non-compartmental analyses were performed on the other three antibiotics, allowing comparison of their excretion in milk of the three species, according to their lipophilicity, their ionization and their plasma pharmacokinetic characteristics.

Thus, beyond the evaluation of the passage of these four antibiotics in milk, this project aims, thanks to the generic PBPK model, to help predict the pharmacokinetic of xenobiotics in the milk of animals and even lactating women.

Keywords: PBPK model, blood-milk barrier, residues, antibiotics, physiology, pharmacokinetic, bioanalysis, accuracy profile