Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2015 **Thèse n°**

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 06 Octobre 2015 à POITIERS
par Monsieur CARREZ Romain
né le 29 Novembre 1990

Utilité d'un modèle pharmacocinétique basée sur la physiologie dans la détermination du risque de résidus lié à l'usage d'un anticoccidien, le monensin, dans les élevages de poulets.

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur COUET William

Membres : Monsieur HENRI Jérôme, Ph.D
Madame BENETON Maud, Docteur en Pharmacie
Monsieur GREGOIRE Nicolas, MCU

Directeur de thèse : Madame le Professeur MARCHAND Sandrine

UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année universitaire 2014-2015

PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique (HDR)
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie
- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- PERKINS Marguerite,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur William COUET de m'avoir fait l'honneur d'être le président de mon jury de thèse, malgré ma demande tardive et plus ou moins imposée. Merci, vous avez toute ma gratitude.

Merci au Professeur Sandrine MARCHAND d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse et de m'avoir donné goût à la pharmacocinétique. C'est grâce à vous si j'en suis là maintenant.

Merci aux membres de mon jury, Jérôme HENRI pour m'avoir encadré durant mon stage à l'ANSES, tu as été un formidable maître de stage et tu m'as permis de m'épanouir professionnellement et personnellement. Merci à Maud BENETON, dont notre collaboration m'a permis de découvrir ma vocation en PBPK. Merci également à Nicolas GREGOIRE d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci aux stagiaires et thésards de l'ANSES de Fougères promo 2015 (Alexis, Jimmy, Kahina, Pegah, Sarah, Vincent, Benjamin, Amandine et Bérengère). On s'est bien marré (travaillé aussi, mais ça, c'est accessoire), même si vous avez utilisé toute la bande passante.

Merci à tous mes potes de fac, Paul, Marie, Antoine, Marion, Julie, Coraline, Thomas, Guillaume. Même si on se plaignait des cours, on a passé de bons moments sur les bancs des amphi, on se dira plus tard : « C'était le bon vieux temps »

Merci à mes potes de lycée, Richard, Dave, Solange, Warren, Emilie pour toutes les parties de tarot, belote et loup-garou. On était quand même une belle bande de branleurs ☺

Et enfin, merci à mes parents, mon frère et plus globalement toute ma famille, c'est grâce à vous que je suis devenu la personne que je suis aujourd'hui.

Table des matières

I. Introduction 1

II. Partie théorique 2

A. Coccidioses 2

1) Définition 2

2) Cycle parasitaire 2

3) Symptômes 4

4) Epidémiologie 5

5) Impact économique 5

6) Prévention 6

B. Le Monensin, un anticoccidien 7

1) Les différentes familles d'anticoccidiens 7

2) Le Monensin 9

C. Evaluation et gestion du risque lié à l'utilisation du monensin. 18

1) Etudes toxicologiques 19

2) Dose Journalière Admissible (DJA) 23

3) Panier de la ménagère et Limites Maximales en Résidus (LMR) 23

4) La gestion du risque : le temps d'attente 26

D. La PBPK comme outil d'étude des résidus 30

1) La pharmacocinétique 30

2) Historique et principes de la PBPK 35

3) La PBPK en pharmacologie vétérinaire 36

4) Représentation du modèle 37

5) PBPK et IVIVE 41

6) Exploitation d'un modèle PBPK 42

III. Partie Pratique 44

A. Matériel et méthode 44

1) Développement du modèle 44

2) Optimisation du modèle 51

3) Validation du modèle 52

4) Analyse de sensibilité 54

B. Résultats 54

1) Optimisation des paramètres 54
2) Validation 57
3) Analyse de sensibilité 62
IV. Discussion 65
V. Conclusion 72
Annexe 73
Bibliographie 79
Résumé 85

Liste des figures :

Figure 1 : Cycle parasitaire d'Eimeria sp. d'après thepoultrysite.com 4

Figure 2 : Structure quasi-cyclique du monensin sodique d'après (Lopes et al., 2001)..... 9

Figure 3 : Déplétion des résidus marqueurs et totaux d'après (Henri, 2008) 22

Figure 4 : graphique représentant le calcul du temps d'attente d'après (Henri, 2008)..... 29

Figure 5 : Calcul de l'AUC par la méthode des trapèzes, d'après (Gabrielsson and Weiner, 2001)..... 31

Figure 6 : Exemple d'un modèle à 3 compartiments, un compartiment central [1] à partir duquel se font l'entrée et la sortie du principe actif et deux compartiments périphériques, l'un à équilibre rapide [2] et l'autre à équilibre plus lent [3]. 32

Figure 7 : Prélèvements chez plusieurs individus pour une étude de pharmacocinétique de population, d'après (Simon et al., 2005) 34

Figure 8 : Diagramme du modèle PBPK final, en vert les paramètres physiologiques, en violet les paramètres pharmacocinétiques et en rouge les paramètres qui seront ajustés. 45

Figure 9 : Courbe de croissance des poulets sur 34 jours 47

Figure 10 : Graphique de la quantité d'aliments ingérée par un poulet 48

Figure 11 : Représentation de la fonction « Pulse » d'acslX®..... 49

Figure 12 : Ajustement du modèle aux données plasmatiques observées (échelle logarithmique) lors d'une administration orale unique de monensin en solution; ligne continue : prédiction ; points : données observées 55

Figure 13 : Ajustement du modèle aux données (échelle logarithmique) plasmatiques (en haut à gauche), hépatiques (en haut à droite), adipeuses (en bas à gauche) et musculaires (en bas à droite) en fonction du temps à l'équilibre du traitement (le 32e jour) par l'aliment supplémenté; ligne continue : prédiction ; points : données observées..... 56

Figure 14 : Concentrations(échelle logarithmique) plasmatiques (en haut à gauche), hépatiques (en haut à droite), adipeuses (en bas à gauche) et musculaires (en bas à droite) observées et prédites en fonction du temps lors de la déplétion (Henri et al., 2009); ligne continue : prédictions moyennes ; points : données observées ; pointillés : limite de quantification ; tirets : limites basses et hautes des prédictions issues de la simulation de Monte-Carlo sur l'ingéré journalier (±3 écarts-type)..... 57

Figure 15 : Corrélation entre les concentrations plasmatiques (en haut à gauche), hépatiques (en haut à droite), adipeuses (en bas à gauche) et musculaires (en bas à droite) observées et prédites 60
Figure 16 : Résidus standardisés (après transformation logarithmique) des concentrations plasmatiques (en haut à gauche), hépatiques (en haut à droite), adipeuses (en bas à gauche) et musculaires (en bas à droite) vis à vis des concentrations prédites 61
Figure 17 : Graphique de l'analyse de sensibilité locale des paramètres pharmacocinétiques 63
Figure 18 : Graphique de l'analyse de sensibilité locale des paramètres physiologiques 64
Figure 19 : Graphique de l'analyse de sensibilité locale des paramètres d'allométrie 65

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Structure des composés du monensin d'après (EFSA, 2004) 10
Tableau 2 : Composition du monensin d'après (EFSA, 2004) 10
Tableau 3 : Résultats de la balance d'excrétion réalisée sur 3 jours d'après (Davison, 1984). 12
Tableau 4 : Structure chimique des métabolites du monensin sodique identifiés chez le 13
Tableau 5 : Occurrence des résistances aux anticoccidiens des isolats d'Eimeria d'après (Stephan et al., 1997) 16
Tableau 6 : DL50 pour différentes espèces animales lors d'une dose orale aiguë 20
Tableau 7 : Composition du panier de la ménagère 24
Tableau 8 : Limites de Quantification (LOQ) chez le poulet de chair 25
Tableau 9 : Sécurité des LMR proposées 25
Tableau 10 : Données des allométries des organes 48
Tableau 11 : Valeurs des paramètres fixés dans le modèle 49
Tableau 12 : Variabilité des paramètres d'ingestion et de la biodisponibilité 53
Tableau 13: Impact de la variabilité simulée de l'ingestion et de la biodisponibilité sur les données prédites 59
Tableau 14 : Corrélation entre les concentrations observées et prédites 60

I. Introduction

La coccidiose est une des maladies majeures des volailles au sein des élevages industriels, et ce par la présence ubiquitaire des coccidies dans l'environnement (Boissieu and Guérin, 2008). L'association de la répartition de cette pathologie et des troubles qu'elle engendre en fait une maladie extrêmement coûteuse pour la production de poulet de chair. La maîtrise de la coccidiose peut se faire par un certain nombre d'outils thérapeutiques, tels que la chimioprophylaxie, en passant par la prévention vaccinale et jusqu'au traitement clinique. Des additifs anticoccidiens sont utilisés communément au sein des élevages. Ces composés, présents dans l'alimentation des animaux, permettent de diminuer à la fois les symptômes de la maladie et la transmission de celle-ci. Les additifs ne sont pas considérés comme des médicaments vétérinaires mais font tout de même l'objet d'une réglementation. Leur réglementation est sous le contrôle de l'EFSA (European Food Safety Authority), contrairement aux médicaments vétérinaires qui dépendent de l'EMA (European Medicines Agency).

Cette réglementation est nécessaire pour déterminer la posologie optimale (balance bénéfice-risque) pour le bien-être animal, mais également pour la sécurité du consommateur de denrées alimentaires issues des volailles. Ces animaux sont élevés pour leur chair : tout ce qui leur est administré se retrouvera dans nos assiettes. Afin de permettre à l'animal d'éliminer naturellement ces composés exogènes, un temps d'attente entre la dernière mise en contact de l'animal avec ce composé et l'abattage de ce même animal est mis en place. Le temps d'attente est un paramètre crucial, pour l'éleveur, l'animal et le consommateur. Un temps d'attente trop long obligera l'éleveur à conserver les volailles plus longtemps dans ses locaux et à les nourrir, engendrant des pertes économiques. Pour l'animal, si le temps d'attente est trop long, il sera plus à risque de développer une coccidiose, n'étant plus sous l'effet de la molécule. Mais un temps d'attente trop faible exposera le consommateur à des doses non négligeables du médicament ou de l'additif alimentaire. Il est donc primordial d'estimer au mieux ce temps d'attente.

La pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK), de par son principe même, permet la prédiction des concentrations d'une molécule dans les tissus et l'extrapolation entre espèce ou sur différentes périodes de la vie. C'est donc également un outil de choix pour un calcul innovant des temps d'attente, en l'associant à des outils statistiques permettant d'étudier la variabilité inter-individuelle autour du modèle moyen.

Cette thèse portera donc sur l'intérêt de la PBPK dans la détermination et la gestion du risque lié à l'utilisation d'un anticoccidien, le monensin, chez le poulet de chair. La première partie de ce travail sera bibliographique, et fera un état des lieux des connaissances sur les coccidioses, le monensin et la pharmacocinétique basée sur la physiologie. La seconde partie présentera les travaux réalisés dans ce cadre : avec l'élaboration d'un modèle PBPK, sa validation et la méthodologie pour un calcul innovant du temps d'attente optimal.

II. Partie théorique

A. Coccidioses

1) Définition

Les coccidioses sont répertoriées comme étant une pathologie digestive du poulet, causée par un protozoaire du phylum des Apicomplexa, de la famille des Eimeridae et du genre Eimeria. Sur les 7 espèces d'Eimeria responsables des coccidioses (*Eimeria tenella, E. acervulina, E. necatrix, E.maxima, E. brunetti, E. mitis* et *E. praecox*), seules les 5 premières sont véritablement pathogènes pour les poulets (Dakpogan et al., 2013).

2) Cycle parasitaire

Les oocystes d'*Eimeria* sont ubiquitaires dans la nature. L'oocyste va sporuler dans le milieu extérieur sous l'effet de conditions optimales (température proche de 25°C, hygrométrie et oxygénation adéquates) pour devenir infectant. Les jeunes poulets se contaminent en les ingérant. Une fois dans le gésier de l'animal, l'oocyste va libérer 4 sporocystes sous l'action du broyage mécanique (étape **A** du cycle, *Figure **1***). Les sporocystes se retrouvent ensuite dans la lumière intestinale, où sous l'effet de facteurs mécaniques (péristaltisme) et

biochimiques (sucs digestifs), chaque sporocyste libère 2 sporozoïtes (**B**). Ces étapes forment la phase de sporogonie.

Ces sporozoïtes vont pénétrer dans une cellule de l'épithélium entérique (**1**) pour procéder à leur reproduction asexuée. Celle-ci consiste en une série de divisions à l'intérieur des entérocytes (**2**), conduisant à la libération d'une multitude de sporozoïtes (**3**). Chaque sporozoïte va ensuite pénétrer dans une nouvelle cellule (**4**). Le sporozoïte se développe à l'intérieur de l'entérocyte dans une vacuole parasitophore, où il se transforme en trophozoïte puis en mérontes (**5**) (encore appelés schizontes). Dans chaque méronte se produit plusieurs divisions cellulaires aboutissants à la production de mérozoïtes. Ces mérozoïtes vont infecter de nouvelles cellules pour reformer un méronte. Il se produit ainsi plusieurs cycles (**6**). Cette multiplication des sporozoïtes puis des mérozoïtes constitue la phase de schizogonie du cycle (ou mérogonie).

Au bout de plusieurs cycles de schizogonie, débutera le commencement de la phase de gamogonie. Les mérozoïtes libérés dans la lumière intestinale vont infecter de nouvelles cellules, et vont se transformer soit en microgamontes (**7**) (qui produiront des microgamètes mâles mobiles (**9**) car munis de flagelles) soit en macrogamontes (**8**) (qui engendreront la production de macrogamètes femelles immobiles). Les microgamètres vont être libérés du microgamonte et iront féconder les microgamètes femelles (**10**). En fusionnant, les 2 gamètes créeront un zygote (**11**), qui sécrètera une coque protectrice et évoluera vers l'oocyste qui sera relargué dans le milieu extérieur avec les fèces (**12**).

Le cycle parasitaire d'Eimeria est monoxène (se déroulant chez un seul hôte), et prend entre 4 et 7 jours pour s'effectuer entièrement, en fonction de l'hôte infecté (*http://eimeria.chez-alice.fr/cycle.html*).

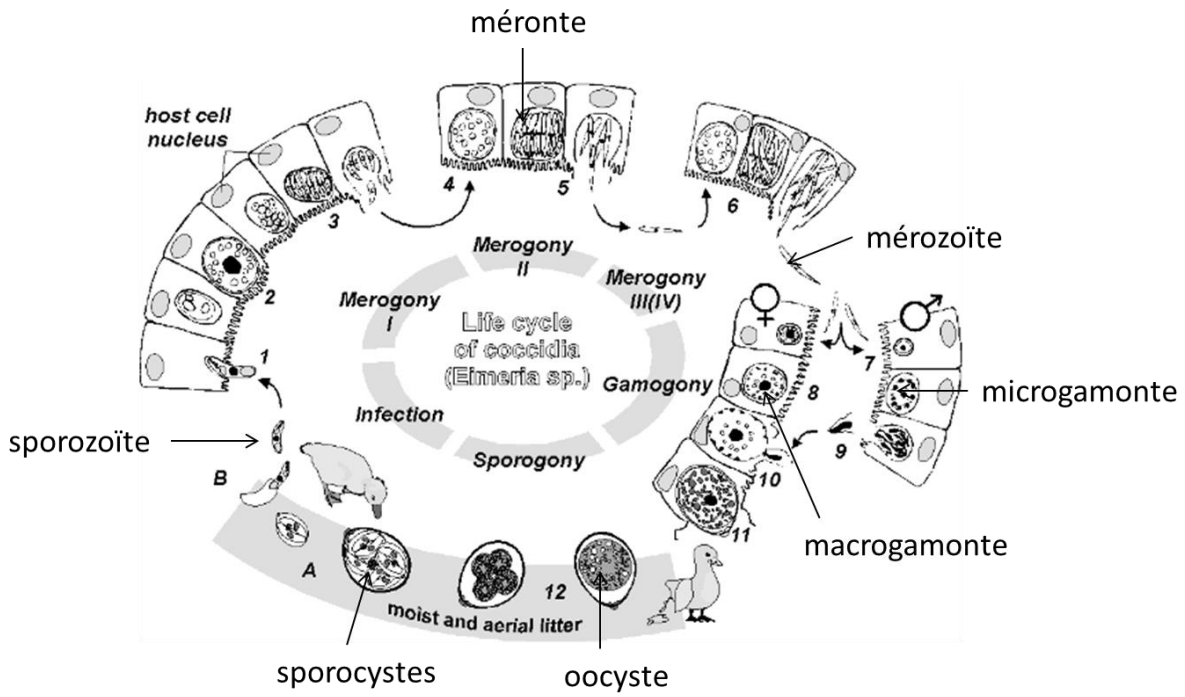


Figure 1 : Cycle parasitaire d'Eimeria sp. d'après thepoultrysite.com

3) Symptômes

Le multiple relargage des sporozoïtes et des mérozoïtes durant la phase de schizogonie entraîne une lyse importante des cellules de l'épithélium intestinal des animaux. La grille de Johnson et Reid (1970) sert de référence pour les lésions coccidiennes et une grille développée par Elanco®, une firme qui produit des coccidiostatiques, a permis d'homogénéiser les notations des lésions intestinales. La combinaison de ces 2 grilles donne un score d'Intégrité Intestinale, qui permet de classer toutes les lésions provoquées par les coccidioses selon leur sévérité. Le pic des lésions coccidiennes apparaît au cours de la 4ème semaine de vie des animaux, avec approximativement 50% des oiseaux atteints (Bostvironnois C., 2011). Les lésions digestives conduisent à une diarrhée, qui peut être sanglante en fonction de la gravité de l'infection, et entraîne également une déshydration par perte de liquide. Les jeunes oiseaux sont les plus sensibles, n'ayant pas encore fait leur immunité (poulet de chair entre 3 et 6 semaines) (Boissieu and Guérin, 2008). La multiple lyse des entérocytes conduit aussi à une malabsorption des aliments, ce qui provoque un ralentissement voir un arrêt de la croissance de l'animal (Dakpogan et al., 2013). De plus, ces dégâts provoqués au sein de l'épithélium digestif constituent un terrain propice à certaines

infections dues à des bactéries gastro-intestinales : clostridies, salmonelles et colibacilles (Bostvironnois C., 2011). Dans les cas extrêmes, l'infection entraîne la mort de l'animal.

Ces symptômes ont plusieurs impacts pour les éleveurs, notamment une perte d'homogénéité des lots, vu que certains animaux ont stoppé précocement leur croissance. Cela conduit à un déclassement de l'animal à l'abattage. On a également une dépigmentation des carcasses (cas du poulet jaune). Au final, l'infection de la volaille par *Eimeria* entraîne une baisse de la rentabilité de la production en élevage industriel.

4) Epidémiologie

En 2004, sur les 1638 zones de productions (RNOEA, 2004), la fréquence relative des coccidioses était de 29.4% chez le poulet (483 coccidioses recensées), ce qui en faisait la première maladie chez cet animal. Le taux de prévalence a été estimé en 2004 à 3.8% (sur 9 mois de renseignements, à raison de 95 troupeaux en moyenne par mois sous surveillance). Ces données ont été recensées par le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture) sous la base du volontariat des vétérinaires qui transmettent les données. Le RNOEA a été fondé en 1987 à la demande de vétérinaires spécialisés en aviculture. Il est animé par l'unité EBEAC (Epidémiologie et Bien Etre en Aviculture et Cuniculture) de l'ANSES de Ploufragan.

Cependant, il est difficile d'avoir des données précises sur les coccidioses puisque l'infection est le plus souvent sub-clinique : les symptômes étant difficilement visibles, la prévalence et l'incidence des coccidioses sont sous-estimées.

5) Impact économique

En 1991, le coût annuel des coccidioses atteignait 450 millions de dollar US (Lloyd-Evans, 1991), montant qui illustre l'impact déjà conséquent des coccidioses.

Mais pour faire face à la demande toujours croissante de la population mondiale, les éleveurs doivent fournir plus de volailles, ce qui augmente les frais de traitement. En 1998, le coût avait évolué à 1.5 milliards de dollars US par année (Stevens, 1998).

Sørensen et son équipe ont déterminé en 2006, par extrapolation, que le coût total des coccidioses (clinique, sub-clinique et leur contrôle) atteignait 2.3 milliards d'euros à travers le monde (Sørensen et al., 2006). 70% de ce coût est uniquement attribuable à l'infection sub-clinique, puisqu'elle réduit fortement le gain de poids chez le poulet, ce qui donne lieu à des déclassements à l'abattage.

Parmi ces coûts se retrouve aussi celui de l'élaboration d'aliments supplémentés en coccidiostatiques : il ne comprend pas uniquement le coût du principe actif, mais aussi le surcoût du prémix, le surcoût dû au rinçage de la chaîne de production (pour éviter les contaminations croisés et les intoxications qui en résultent), à la main d'œuvre supplémentaire, au transport, à la marge effectuée par le fabriquant. Au final, l'élevage avec un aliment supplémenté en coccidiostatiques provoque un surcoût d'environ 0.0206 euros par poussin (Watier, 2011).

6) Prévention

La lutte contre la coccidiose passe d'abord par la prévention (vetosaintbrice.fr) :

- Hygiène et ambiance des bâtiments d'élevage : lutte contre l'humidité, entretien des litières, utilisation de superphosphates, aération, nettoyage des mangeoires et zones souillées par des excréments,
- Isolement strict des malades, désinfection ou nettoyage à l'eau bouillante des locaux souillés,
- Réduction des facteurs de stress,
- Gestion raisonnée de l'allotement (séparation des animaux en lots pour augmenter la productivité): éviter de mélanger des animaux de générations différentes avec des statuts immunitaires différents.

Mais l'utilisation d'additifs anticoccidiens dans l'alimentation occupe 95% des méthodes de prévention (De Gussem, 2007). Des vaccins vivants, tolérants ou non aux anticoccidiens, peuvent aussi être employés mais sont à l'origine d'un coût supplémentaire pour les éleveurs. Le cycle parasitaire durant 1 semaine, l'immunité protectrice des oiseaux peut survenir dès la 3ème semaine de vie des poussins, s'ils ont été contaminés dès leur naissance.

Parfois, le contact avec le parasite survient plus tard, et l'immunité ne sera effective qu'au bout des 6-7ème semaines (Bostvironnois C., 2011). Les jeunes oiseaux sont donc les plus vulnérables, il est donc primordial de les protéger dès leur naissance, notamment avec l'utilisation d'une alimentation supplémentée en anticoccidiens, comme le monensin.

B. Le Monensin, un anticoccidien

1) Les différentes familles d'anticoccidiens

En fonction de leur usage, thérapeutique ou prophylactique, différentes familles d'anticoccidiens sont utilisées.

Tous doivent répondre à ces caractéristiques (Règlement (CE) no 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil) :

- être actifs vis-à-vis de toutes les espèces présentes chez l'hôte
- ne pas être toxiques pour l'hôte
- ne pas avoir d'incidences sur la qualité de la viande ou de la carcasse
- être compatibles avec les autres composants de l'aliment
- ne pas nuire à la santé du consommateur

a) Usage thérapeutique

Pour un usage thérapeutique, les 2 principes actifs qui seront utilisés sont l'amprolium et le toltrazuril (par arrêté du 19 Décembre 2014 modifiant l'arrêté du 28 Juin 2011 fixant la liste des médicaments vétérinaires prévue au deuxième alinéa de l'article L. 5143-6 du Code de la Santé Publique).

- L'amprolium, un analogue de la thiamine, inhibe le transport de la thiamine dans les espèces d'*Eimeria,* perturbant ainsi la synthèse de glucides. L'efficacité de l'amprolium peut être réduite par l'administration concomitante de produits contenant des complexes de vitamines B (CBIPvet.be). Cette molécule est très

faiblement absorbée, ce qui lui permet d'agir sur les sporozoïtes présents dans la lumière intestinale, et d'avoir peu d'effets systémiques.

- Le toltrazuril affecte en premier lieu la chaîne respiratoire d'*Eimeria*, puis deux enzymes responsables de la synthèse des pyrimidines (Harder and Haberkorn, 1989). Il est actif lors de la schizogonie et de la gamogonie (Haberkorn and Stoltefuss, 1987).

b) Usage prophylactique

Utilisés au sein de l'alimentation des animaux, ces produits ne sont pas de médicaments mais des additifs alimentaires. Leur législation ne dépend plus de l'EMA (Agence Européenne du Médicament) mais de l'EFSA (Agence Européenne de Sécurité de l'Alimentation).

Les anticoccidiens prophylactiques sont représentés par la classe des ionophores, du grec « iono » ion et « phore » porteur. Ces ionophores, par fixation de cations, vont former des complexes liposolubles qui vont traverser les membranes et ainsi perturber la balance osmotique. Les ionophores sont classés en 3 catégories, selon le mode de transport du cation :

- Les « quasi-ionophores », qui vont former un pore dans la membrane grâce à leur structure polypeptidique, permettant le passage des ions en fonction de leur gradient de concentration. En cela, ils ne forment pas réellement de complexes avec les cations et sont différents des 2 autres catégories.
- Les ionophores neutres (comme la valinomycine), qui se localisent à l'intérieur de la bicouche lipidique des membranes cellulaires. Par diffusion, ils se retrouvent en surface où ils peuvent capter un cation. Toujours par diffusion, le complexe lipophile va migrer vers l'intérieur de la bicouche pour finalement arriver à l'intérieur de la cellule. Le complexe va se dissocier, libérant le cation dans le cytoplasme. L'ionophore neutre va alors reprendre sa place dans la bicouche pour effectuer un nouveau cycle.
- Les ionophores carboxyliques (classe à laquelle appartient le monensin) ont un mécanisme de transport un peu différent de celui des ionophores neutres. Il sera détaillé dans la prochaine partie.

2) Le Monensin

a) Structure et propriétés

Les polyéthers carboxyliques, dont fait partie le monensin, sont majoritairement synthétisés par des champignons saprophytes de genre Streptomyces (Butaye et al., 2003), également producteurs des antibiotiques avec le suffixe –ycine. La structure de ces ionophores carboxyliques consiste en une suite d'éthers intra cycliques (Figure 2), qui forment une « poche » dans laquelle peut s'insérer un cation maintenu prisonnier par des interactions ion-dipôle. De par cette structure, ces composés forment des complexes liposolubles avec des cations (Na+, K+, Ca2+) et leur permettent de traverser les membranes (Pressman, 1968).

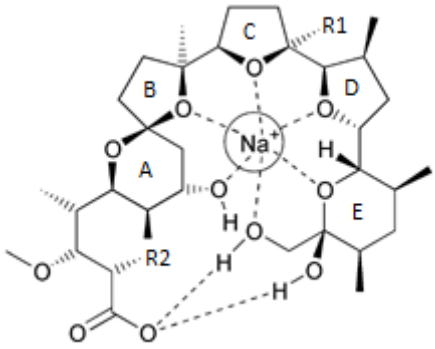


Figure 2 : Structure quasi-cyclique du monensin sodique d'après (Lopes et al., 2001)

Les ionophores carboxyliques sont des molécules chargées négativement à pH physiologique. Ils se localisent à l'extérieur de la cellule, au contact de la membrane. Lors de sa complexion avec un cation (Na^+, Ca^{2+}), il se forme un zwitterion, entité neutre électriquement. Cette neutralité lui permet de traverser la membrane cellulaire. Arrivé à l'intérieur de la cellule, le complexe se dissocie, provoquant la libération du cation dans le cytoplasme de la cellule. Puis l'ionophore se complexe à un autre cation (par exemple le potassium K^+ ou un proton) pour effectuer le chemin inverse et ainsi recommencer un nouveau cycle. Ce que l'on appelle monensin est en fait un mélange de plusieurs entités chimiques (synthétisés par Streptomyces), qui diffèrent par leur groupement R1 et R2 (voir figure 2) comme indiqué dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Structure des composés du monensin d'après (EFSA, 2004)

	R1	R2
Monensin A	C_2H_5	CH_3
Monensin B	CH_3	CH_3
Monensin C	C_2H_5	C_2H_5
Monensin D	Non fournie	Non fournie

Le monensin est présent au sein de 2 spécialités utilisables pour l'incorporation à l'alimentation des volailles : l'Elancoban® et le Coxidin®. Les firmes qui les produisent garantissent la composition suivante :

Tableau 2 : Composition du monensin d'après (EFSA, 2004)

Composition du monensin	Masse (%)
Monensin A	>95%
Monensin A+B	>96%
Monensin C+D	>2%

Le monensin est donc composé très majoritairement de l'entité A (>95%), auquel est ajouté les composés B, C et D, qui occupent au maximum 5% de la masse finale du mélange (EFSA, 2004). La détermination des proportions du mélange est réalisée par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC).

b) Pharmacologie aviaire du monensin

- Pharmacocinétique[1]

- Absorption

[1] *S'il n'y a pas de précisions, les résultats sont communiqués sous forme moyenne ± écart-type*

La première étude sur le monensin chez le poulet a été effectuée en 1969 (Herberg and Van Duyn, 1969). Du [^{3}H]monensin a été administré oralement à des poulets. Ils ont trouvé que seulement moins de 2% de la radioactivité était présente dans les tissus et l'urine, ce qui pourrait indiquer une très faible absorption. Cependant, au moins 75% de la radioactivité était associée à l'eau tissulaire. Cette faible valeur de biodisponibilité et la présence associée à l'eau pourraient avoir comme origine l'échange entre l'hydrogène de l'eau et le tritium du monensin, et ce dès l'administration par voie orale. Pour vérifier cette hypothèse, une seconde étude (Donoho et al., 1978) a été faite avec du monensin marquée au carbone 14, chez le bétail et le rat. Encore un fois, la quasi-totalité de la radioactivité a été retrouvée au sein des fèces. Mais la possibilité que le monensin soit éliminé par voie biliaire n'a pas été envisagée. C'est donc avec ce but que Davison a réalisé son étude en 1984 (Davison, 1984) : 100 mg de monensin marquée au carbone 14 ont été administré à des poulets âgés de 5 mois et un an, dont la vésicule biliaire avait été canulée : en récoltant les fientes uniquement (sans la bile qui s'y déverse), il a alors été calculé que le monensin avait une biodisponibilité orale comprise entre 11 et 31%. Une autre étude plus récente avec quantification par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (Henri et al., 2009), a démontré elle aussi une biodisponibilité orale comprise entre 11 et 30% (suivant la méthode d'estimation), apportant en plus des informations sur la constante de vitesse d'absorption (Ka) estimée à 3.85 h^{-1}. Après une administration orale, le monensin est rapidement absorbé et se retrouve dans la circulation systémique. Le temps, T_{max}, pour atteindre la concentration maximale (C_{max}) est d'environ 1h après l'administration orale (Henri et al., 2009). Ce T_{max} prend aussi en compte un temps de latence (T_{lag}) inférieur à une demi-heure. Lors de la prise alimentaire, la nourriture et/ou l'eau n'arrive(nt) pas directement au niveau du site majoritaire d'absorption, qui est l'intestin. Il existe une phase de dépôt dans le jabot et une phase de digestion dans le gésier. Il faut noter que les deux études précédemment citées ont été réalisées avec du monensin en solution, donc ayant une bioaccessibilité complète qui n'affecte pas la biodisponibilité. La faible biodisponibilité du monensin par voie orale lui procure un avantage pharmaceutique certain, puisque son action thérapeutique se situe dans la lumière intestinale et ses effets indésirables viennent de son passage systémique.

- Distribution

Lors de son étude en 1984, Davison a pu évaluer l'exposition des tissus aux monensin, dont les expositions en pourcentage sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3) où les valeurs exposées correspondent au pourcentage de la dose retrouvée dans les tissus. :

Tableau 3 : Résultats de la balance d'excrétion réalisée sur 3 jours d'après (Davison, 1984)

	Dose	Fientes (%)	Bile (%)	Vésicule biliaire(%)	Tractus GI (%)	Foie (%) ($x10^{-3}$)	Reins (%) ($x10^{-3}$)	Carcasse (%)	Total (%)
Groupe 1	100mg	59.3±6.1	15.2±2.2	0.32±0.25	18.1±7.8	29±5	5±0.7	0.37±0.08	93.5±1.9
Groupe 2	12mg	78.1±1.6	13.5±0.8	0.55±0.52	0.23±0.06	15±4	3±0.3	0.11±0.03	92.5±2.6

La quasi-totalité de la radioactivité est retrouvée au niveau des fientes (donc non absorbée), de la bile et au tractus gastro-intestinal.

Du fait de sa structure et de sa lipophilie (logP = 4.82) (*chemicalize.org*), le monensin se distribue largement et possède une affinité marquée pour les tissus adipeux : ceci explique son volume de distribution à l'état d'équilibre (Vss) élevé, estimé (approche non-compartimentale) proche de 8 L/kg (Henri et al., 2009). Lors de cette étude, les expositions au monensin des différents organes du poulet (foie, muscle et graisse) ont été déterminées, par obtention de coefficients de partage (Kp). Il faut noter que les reins ne sont pas cités dans cette étude par défaut de méthode de dosage validée dans ce tissu.

Les expositions plasmatiques au monensin ont également été modélisées selon une approche compartimentale, le modèle caractérisant le mieux la distribution du monensin étant un modèle bi-compartimental, compatible avec la distribution hors de la circulation systémique et sans accumulation marquée. La liaison aux protéines plasmatiques a également été étudiée *in vitro* et se situe à 22.8% (avec une erreur standard de 0.86%, l'étude étant réalisée sur 5 poulets) (Atef et al., 1993).

- Métabolisme

Le monensin a un métabolisme essentiellement de phase I, c'est-à-dire par des enzymes oxydatives de la famille des cytochromes. La sous-famille de cytochromes la plus impliquée est la 3A (Nebbia et al., 1999). Chez le poulet, le dindon et le rat, 9 métabolites ont été

identifiés (EFSA, 2004),d'après les études de (Donoho et al., 1982) et (Davison, 1984) sur le métabolisme du monensin. Ces métabolites résultent d'une phase d'oxydation par des processus de déméthylation, décarboxylation et de mono/dihydroxylation comme résumé dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Structure chimique des métabolites du monensin sodique identifiés chez le poulet (P), le dindon (D) et le rat (R) d'après (EFSA, 2004)

Métabolite	Groupe R2 (cf. figure 1)	Autres modifications
Monensin sodium	-O-CH3	-
$M1_{P,D,R}$	-OH	-
$M2_{P,D,R}$	-OH	monohydroxylation sur le cycle E
$M3_{P,D,R}$	-OH	monohydroxylation sur le cycle E (épimère M2)
$M4_{D,R}$	-OH	monohydroxylation sur le cycle D
$M5_{D}$	-O-CH3	monohydroxylation sur le cycle D
$M6P_{D,R}$	=CO	décarboxylation
$M7_{P,R}$	-OH	monohydroxylation sur les cycles B, C ou D
$M8P_{D,R}$	-OH	dihydroxylation sur les cycles B, C ou D
$M9_{P}$	=CO	décarboxylation et monohydroxylation sur le cycle E

D'un point de vue quantitatif, le monensin sous forme inchangée et le métabolite M2 représente chacun au moins 10% de la radioactivité totale retrouvée dans les excrétas de poulet, tandis que les autres métabolites comptent chacun pour moins de 10%. On note aussi la présence d'un grand nombre de métabolites mineurs (EFSA, 2004).

Comme énoncé, le métabolisme du monensin est essentiellement de phase I, c'est-à-dire par des phénomènes d'oxydations : l'étude de ce métabolisme, en particulier l'étude de la vitesse de métabolisation, est donc possible *in vitro* sur des microsomes (Henri et al., 2008), qui sont des fragments de réticulum endoplasmique et d'appareil de Golgi, récupérés après

centrifugation de morceaux de foie broyés (6 poulets Ross, âgés de 7 semaines). C'est par cette méthode qu'ont été déterminés 2 paramètres de disparition du monensin en tant que substrat : la vitesse maximale enzymatique V_{max} et la constante de Michaelis K_M, qui sont respectivement de 646±140 pmol/mg/min et de 28.6±12.4 µM. Cette étude, réalisée sur une plage de concentrations allant de 0.05mM à 0.5mM montrent une saturation du métabolisme, saturation décrite avec un modèle « Emax simple ».

- Excrétion

Comme décrit en 1984 par Davison *et al.*, lors d'une étude de la balance d'excrétion, la très grande majorité du monensin (92.6%) marqué au carbone 14 a été retrouvé dans les fientes, la bile et le tractus digestif. Chez le poulet, les fèces et l'urine sont mélangés dans les fientes. Afin de déterminer l'origine de la radioactivité, des poulets ont été colostomisés dans le but de séparer les fèces et l'urine. Grâce à cette expérimentation, on a pu déterminer que la quantité de monensin retrouvée dans les urines ne comptait que pour 1%. L'élimination pulmonaire du monensin a également fait l'objet d'une expérimentation, avec 2 poulets placés en chambre respiratoire. L'élimination pulmonaire est équivalente à l'élimination rénale, proche de 1%.La clairance totale a été déterminée à 2.17 L/h/kg (Henri et al., 2009).

- Pharmacodynamie

De par sa structure lipophile, le monensin se fixe aux membranes cellulaires et agit comme un « transporteur», permettant le passage membranaire des cations suivant leur gradient, les plus affectés étant les ions Na^+, K^+ et Ca^{2+}.

- Activité anti-bactérienne

L'action antimicrobienne du monensin vient surtout du gradient de proton, conduisant à une baisse du pH intracellulaire. Le micro-organisme réagit en augmentant le rejet actif, entrainant une augmentation de la consommation en ATP, et finalement à un épuisement cellulaire. Cet effet est impossible sur les bactéries Gram négatives, car leur membrane

externe ne permet pas la pénétration de molécules de poids moléculaire élevé comme le monensin (EFSA, 2004).

- Activité anticoccidienne

D'un point de vue mécanistique, sa capacité à lier les cations et à se fixer dans les membranes fait du monensin un anticoccidien très efficace. En modifiant les potentiels électriques des coccidies, le monensin oblige les mitochondries du protozoaire à produire toujours plus d'ATP pour maintenir l'équilibre électrolytique, ce qui conduit à un épuisement de la synthèse d'ATP. Incapable de rétablir son équilibre électrolytique, les mouvements d'eau suivent les mouvements des cations, aboutissant à la lyse cellulaire. En diminuant le nombre de sporozoïtes intra-luminaux, le monensin permet d'affaiblir le cycle du parasite, réduisant ainsi les dommages entériques. De plus, le monensin a également une activité intra-entérocytaire sur les sporozoïtes, en laissant relativement intact les cellules intestinales (Chapman et al., 2010). Le monensin est efficace chez le poulet contre *Eimeria acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix et E. tenella (*Dakpogan et *al.,* 2013*)*.

- Résistances

La résistance est un problème majeur en thérapeutique (ANSES, 2014). Dès 1996, une étude réalisée en Allemagne du Nord (Stephan et al., 1997) montrait l'apparition de résistance. 90% des isolats d'*Eimeria* avaient une résistance à un anticoccidien, dont les résultats sont résumés dans le tableau 5:

Tableau 5 : Occurrence des résistances aux anticoccidiens des isolats d'Eimeria d'après (Stephan et al., 1997)

Anticoccidien (famille)	Pourcentage de résistance des isolats
Maduramicine (ionophore carboxylique)	70%
Monensin (ionophore carboxylique)	60%
Salinomycine (ionophore carboxylique)	50%
Nicarbazine (complexe synthétique non ionophore)	80%
Halofunginone (dérivé des quinazolinones)	70%
Robenidine (composé synthétique non ionophore)	10%
Toltrazuril (triazinones)	10%
Diclazuril (triazinones)	20%

De plus, les résistances multiples ont été développées dans 70% des isolats.

Aux Etats-Unis, en 1994, une étude (Chapman and Hacker, 1994) a été réalisée sur 2 fermes de l'Arkansas, dans le but de vérifier si des exploitations situées dans le même complexe se partagent les modes de résistance. En effet, l'usage intensif du monensin dans les 2 fermes a vu émerger des résistances. Tous les isolats d'*Eimeria* (espèces *acervulina* et *maxima*) ont été déterminés résistants au monensin, c'est-à-dire une perte de plus de 50% de l'efficacité.

- Effets cardio-vasculaires

La plupart des cellules activables sont quiescentes aux concentrations basales de Ca^{2+} (10^{-7}M) et sont stimulées pour exprimer leurs fonctions spécialisées à des concentrations 100 à 10.000 fois supérieures (10^{-5} à 10^{-3}M). Une des sources du calcium qui permet de déclencher la réponse cellulaire est le milieu extracellulaire, dont la concentration en calcium dépasse 10^{-3}M. Le monensin, en augmentant la perméabilité des membranes, permet l'équilibration du gradient du calcium et ainsi peut déclencher une réponse cellulaire (Pressman and Fahim, 1982).

Avec l'élévation du calcium intracellulaire, on observe une levée de l'inhibition par la troponine I. En effet, en se liant au calcium, il y a un changement de conformation de la

troponine C, ce qui permet de démasquer les sites de liaison entre les filaments d'actine et la myosine. Il y a donc contraction du muscle cardiaque (Shlafer et al., 1978).

Cette même élévation du calcium intracellulaire, semblable à celle du relargage de calcium par le réticulum sarcoplasmique lors de l'arrivée d'un potentiel d'action ainsi qu'à l'ouverture des canaux calciques, va provoquer un plus grand nombre de complexes calcium-calmoduline. Ce complexe va activer la kinase des chaînes légères de myosine, conduisant à une augmentation de la contractilité des cellules du système cardio-vasculaire, se traduisant par des effets chronotrope et inotrope positifs (Haynes et al., 1974). Ces effets sont augmentés par la stimulation de cellules sécrétrices et la libération de catécholamines par les surrénales et le cœur (Pressman and deGuzman, 1975). Cette implication des catécholamines est prouvée par l'inhibition des effets cardio-vasculaires du monensin par un β-bloquant.

A de faibles doses (2-25 µg/kg), l'activité cardio-vasculaire du monensin se résume à une augmentation du flux coronaire. Comme ni le débit cardiaque, ni la pression artérielle aortique ne sont augmentés, l'augmentation de ce flux doit être dû à un relâchement des résistances coronaires (Pressman and deGuzman, 1975).

A des doses plus fortes, le monensin entraîne des contractures, une augmentation de la pression artérielle et des effets chronotrope et inotrope positifs.

- Autres effets

Le monensin est utilisé chez le bétail car il augmente la fermentation dans le rumen, conduisant à un augmentation de la conversion de la nourriture en viande (Pressman and Fahim, 1982).

De plus, le monensin possède un effet hyperglycémiant d'après des études réalisées sur des chiens et des lapins, qu'ils soient anesthésiés ou conscients (Fahim and Pressman, 1981).

- Usage anticoccidien du monensin en élevage aviaire

Le monensin, qui est utilisé dans l'alimentation pour influencer favorablement les performances des animaux en bonne santé, est défini d'un point de vue réglementaire

comme étant un additif zootechnique soumis à ce règlement. Le monensin, comme additif à l'alimentation chez la poule pondeuse de moins de 16 semaines et chez le poulet de chair est présent au sein de 2 spécialités : le Coxidin® et l'Elancoban® (dont la teneur en monensin est différente, 20% et 25% respectivement), utilisées pour le contrôle des coccidioses. L'EFSA recommande d'utiliser des concentrations de monensin comprises entre 100 et 125 mg/kg d'aliments (EFSA, 2011). Une concentration de 100 mg/kg d'aliment est suffisante pour maintenir une faible exposition aux coccidioses et une concentration supérieure à 125 mg/kg d'aliment sera susceptible d'entraîner des risques pour la volaille et pour l'environnement. Cet usage, comme pour tout usage de médicaments ou d'additifs dans les filières destinés à la consommation humaine est réglementé au niveau européen.

C. Evaluation et gestion du risque lié à l'utilisation du monensin.

Les directives 70/524/CEE et 96/51/CEE de l'Union Européenne énoncent les règles de base concernant l'autorisation, l'utilisation et la commercialisation des additifs pour l'alimentation animale. Cette autorisation des additifs concerne leur utilisation dans des aliments destinés soit à certaines espèces animales, soit à certains groupes d'espèces animales (différentiation entre poulet de chair et la poulette destinée à la ponte par exemple). Toute entreprise souhaitant obtenir une autorisation pour un additif doit présenter un dossier contenant les données scientifiques voulues (études de toxicité, étude du métabolisme, proposition de limites maximales de résidus). Ces dossiers de demande d'évaluation de produits réglementés comme les additifs alimentaires sont soumis à l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA). Le règlement CE n°1831 /2003 (EU, 2003) a pour objet d'établir une procédure communautaire pour l'autorisation de mise sur le marché et l'utilisation des additifs dans l'alimentation animale.

Dans un but de protection du consommateur, à partir des études toxicologiques réalisées chez l'animal, on retiendra la Dose Sans Effet (DSE) qui servira de base pour le calcul de la limite à laquelle l'Homme ne doit pas être exposé.

1) Etudes toxicologiques

a) Dose Sans Effet (DSE)

La DSE est la plus forte dose qui n'entraîne aucun effet sur un organisme lorsqu'elle est absorbée quotidiennement, que l'effet soit thérapeutique ou secondaire. Celle-ci est purement toxicologique et spécifique d'une espèce, car il existe des différences de sensibilité qui peuvent être dues à la pharmacocinétique de la molécule (plus forte absorption, métabolisme différent aboutissant à une augmentation de la production d'un composé toxique ou à une diminution de la détoxification, ou une élimination amoindrie) ou à sa pharmacodynamie (effet majoré pouvant être dû à des isoformes de récepteurs par exemple). La DSE, encore connue sous le sigle NOEL (pour No Observed Effect Level), est donc exprimée en mg de substance par jour et par kilogramme de poids vif de l'animal : ainsi, il est possible de comparer les différentes espèces entre elles. La DSE est déterminée à partir de toutes les études réalisées sur les animaux, que l'effet étudié soit à court terme (dose unique) ou à long terme (doses répétées).

- Etudes à court terme

La toxicité d'une dose unique de monensin a été testée sur un grand éventail d'espèces par (Todd et al., 1984). Les différents signes de toxicité étaient similaires entre les espèces et comprenaient anorexie, hypoactivité, faiblesse musculaire, ataxie, diarrhée et diminution du gain de poids. Les différentes Doses Létales 50 (DL50, c'est à dire la dose qui entraîne la mort de la moitié des animaux) sont récapitulées dans le tableau ci-dessous (Tableau 6):

Tableau 6 : DL50 pour différentes espèces animales lors d'une dose orale aiguë

Espèce	Genre	DL50 (mg/kg de poids vif)
Cheval		2-3
Mouton		12
Chien	Femelle Mâle	>10 >20
Porc		17-50
Bétail		22-80
Rat	Femelle Mâle	24.3 40.1
Chèvre		26
Lapin		42
Pintade		95
Souris	Femelle Mâle	96 70-108
Poulet		200-231
Dindon	Femelle Mâle	416 347
Singe		>160

Cette étude, qui n'a aucun intérêt pour la recherche de la DSE puisqu'on cherche un effet toxique, permet en revanche de cibler les animaux les plus sensibles et chez qui on aura la DSE la plus faible.

Des études pharmacologiques sur la toxicité cardiaque ont été réalisées sur le chat et le chien (EFSA, 2004). Concernant le chien (race Beagle), des doses orales de 0, 0.138, 0.345, 0.69 et 1.38 mg/kg ont été administrées. Les doses supérieures ou égales à 0.69 mg/kg ont montré une augmentation du flux sanguin dans les coronaires. Aucune des doses administrées n'ont augmenté la pression artérielle ou le rythme cardiaque. Pour cette étude, la DSE était donc de 0.345 mg/kg. Comme nous le verrons par la suite, il s'agit ici de la plus

faible dose n'entrainant aucun effet. Elle sera donc retenue pour les calculs effectués afin de protéger le consommateur.

Chez le chat anesthésié (race non précisée), une dose de 30 mg/kg n'a eu aucun effet sur les réflexes spinaux, la pression artérielle, le rythme cardiaque, la respiration ou l'électrocardiogramme. Comme aucun n'est relevé à cette dose, la DSE chez le chat doit être supérieure à 30 mg/kg.

- Etudes à long terme

Ces études à long-terme, qui comprennent la toxicité des doses répétées, la toxicité de la reproduction, la cancérogénèse, doivent répondre à des exigences réglementaires (OMS, 2000) concernant :

- Les espèces animales : les études doivent être réalisées sur au moins 2 espèces animales, dont l'une appartenant à la famille des rongeurs.
- Le sexe des animaux : il peut exister une variabilité inter-genre. Afin de tester cette hypothèse, il convient de réaliser les études selon un ratio 1:1.
- Le nombre d'animaux : pour les rongeurs, 10 animaux/dose/genre sont utilisés ; concernant les non-rongeurs, des groupes de 3 animaux/dose/genre sont préconisés.
- La voie d'administration : il convient d'utiliser la voie cliniquement prévue
- La durée du traitement : elle dépend de la durée d'exposition clinique. Elle varie entre 2 semaines (si la prise clinique est unique ou répétée pendant moins d'une semaine) et 2 ans (pour les études de cancérogénèse).
- Les niveaux de doses : ils doivent être au moins 2, un qui n'entraine aucune toxicité et l'autre qui entraine des effets manifestes. Des groupes intermédiaires peuvent être utiles, pour pouvoir déterminer une relation dose-effet.

Chez le rat (race Harlan Wistar), la DSE relevée lors d'études de la toxicité chronique provient d'une étude sur la carcinogénèse soumise aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). La DSE pour cette étude est de 1.14 mg/kg/j pour les rats mâles, basée sur une réduction du gain de poids (EFSA, 2004).

Chez le chien Beagle, lors d'une étude sur un an, une DSE de 2.5 mg/kg/j a été identifiée (EFSA, 2004) sur la base de divers signes de toxicité (réduction du gain de poids, anorexie transitoire, hypoactivité).

b) Etude du métabolisme et résidu marqueur

L'objectif de cette étude consiste en l'évaluation de la déplétion des différents résidus du principe actif dans les tissus. Grâce à l'utilisation d'un composé radiomarqué et de méthodes analytiques développées et validées par l'industriel, il est possible de différencier les différents métabolites et de les quantifier. Pour cela, des échantillons des différents tissus sont prélevés et analysés lors de plusieurs échéances. L'ensemble des profils cinétiques des différents métabolites et de la molécule mère sont donc disponibles. Grâce à ces données, il sera possible de déterminer un composé qui sera dit « marqueur », dont le profil est semblable au profil des résidus totaux et donc qui sera considéré représentatif de l'ensemble des résidus (Figure 3). Cette corrélation permet de travailler uniquement sur ce composé marqueur.

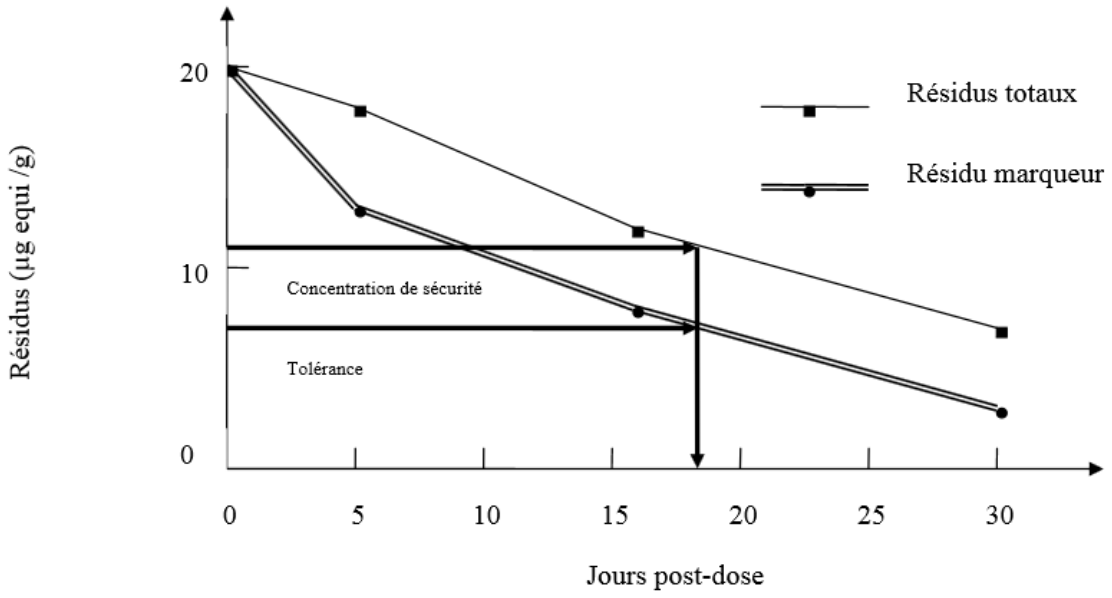


Figure 3 : Déplétion des résidus marqueurs et totaux d'après (Henri, 2008)

Bien que représentant moins de 5% des résidus totaux, le monensin est considéré comme étant son propre résidu marqueur (EFSA, 2004). Il est défini pour chaque tissu d'intérêt un ratio marqueur/résidu total. Ainsi, en ne dosant que le résidu marqueur, on évalue la quantité de l'ensemble des résidus dans le tissu.

2) Dose Journalière Admissible (DJA)

La Dose Journalière Admissible (DJA) est la dose maximale d'une substance (exprimée comme la DSE en mg de substance par kilogramme de poids corporel et par jour) à laquelle on peut être exposé de façon répétée tout au long de la vie sans risque pour la santé. En cela, elle ressemble à la DSE. Mais la DSE est purement toxicologique alors que la DJA a une valeur de sécurité d'exposition. En effet, on applique à cette DSE retrouvée chez l'animal des coefficients de sécurité. Le premier coefficient correspond au passage entre l'animal et l'Homme, et prend une valeur de 10 : on estime que l'Homme est 10 fois plus sensible que les animaux chez lesquels on a réalisé des études toxicologiques. Dans ce coefficient, la part de la variabilité est due pour 60 % à la toxicocinétique et pour 40% à la toxicodynamie. Les études toxicologiques sont réalisées sur un petit nombre comparé à la population humaine qui sera exposée. Pour contrer cette faible variabilité chez l'animal, un deuxième coefficient de sécurité est appliqué à la DSE, lui aussi de facteur 10. Il correspond à la variabilité inter-individuelle que l'on retrouvera chez l'Homme, où la toxicocinétique et la toxicodynamie occupe une place égale. Au final, un coefficient de 100 est appliqué à la DSE pour protéger le consommateur. Dans les cas où la DSE n'est pas bien définie, un coefficient supplémentaire peut être appliqué. Ce coefficient peut également être réduit si des informations prouvent que la variabilité appliquée n'est pas aussi étendue.

Dans le cas du monensin, la DSE est définie à 0.345 mg/kg/j chez le chien. En appliquant les facteurs de sécurité précédemment expliqués, la DJA chez l'Homme est de 0.003 mg/kg/j.

3) Panier de la ménagère et Limites Maximales en Résidus (LMR)

On entend par résidus toutes les substances pharmacologiquement actives, qu'il s'agisse de principes actifs, de métabolites ou d'excipient, susceptibles d'être retrouvées dans les

denrées alimentaires (viande, abats, lait, œufs, miel…) produites par les animaux suite à l'administration d'une substance. Pour chaque spécialité administrée à la dose autorisée, l'industriel détermine la pharmacocinétique des résidus dans les tissus et les productions.

La limite maximale en résidu est la concentration maximale en résidus résultant de l'usage d'un médicament vétérinaire ou d'un additif qui est recommandée par la Commission Européenne comme étant légalement permise ou reconnue acceptable dans les denrées d'origines animales. Des LMR sont proposées par les firmes, de sorte qu'avec la consommation moyenne d'une certaine quantité d'aliments appelée panier de la ménagère, les doses ingérées ne dépassent pas les DJA.

Depuis 2008, la composition du panier de la ménagère (Tableau 7) est de:

Tableau 7 : Composition du panier de la ménagère

	Foie	Muscle	Rein	Graisse/Peau
Consommation (kg/j)	0.100	0.300	0.010	0.090

Des LMR sont proposées comme étant la limite de teneur maximale en monensin dans chaque tissu. Les LMR proposées doivent être au-dessus du niveau que l'on peut attendre dans le pire des cas, si le temps d'attente décidé est appliqué par l'éleveur. De plus, elles doivent être suffisamment hautes pour s'assurer qu'elles soient analysées en toute sécurité : si la LMR est trop proche de la Limite de Quantification (LOQ), cela augmenterait l'incertitude sur les processus de contrôle et par la suite sur la LMR opérationnelle. Par conséquent, les LMR doivent être au moins trois fois supérieures à la plus sensible des méthodes analytiques.

Une technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem élaborée en 2007 (Chéneau et al., 2007) a pu mesurer des LOQ pour le monensin dans les différents tissus, dont les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 8) :

Tableau 8 : Limites de Quantification (LOQ) chez le poulet de chair

	Foie	Plasma	Reins	Muscles	Graisse/Peau
LOQ (µg/kg de tissu)	1	2.5	2.5	2.5	2.5

Ainsi, les LMR proposées pour le foie, les reins et les muscles sont de 8 µg/kg de tissus. A cause d'une plus grande variation en teneur de graisse des échantillons, le LMR proposée pour ce tissu est plus importante (25 µg/kg de tissu) (EFSA, 2011).

En multipliant cette teneur maximum en monensin par la quantité de tissu ingéré, tout en prenant en compte le rapport marqueur/résidus totaux, il est possible de déterminer le DITR (Daily Intake of Total Residues traduit comme étant l'apport quotidien en résidus totaux). Ce DITR doit alors être inférieur à la Dose Journalière Admissible. Les LMR proposées ci-dessous (Tableau 9) permettent de respecter la DJA pour le foie, les reins, les muscles et la peau/graisse (respectivement 97 et 101% pour l'Elancoban® et le Coxidin®)

Tableau 9 : Sécurité des LMR proposées

	Foie	Reins	Muscles	Peau/Graisse	Somme
	Elancoban®				
Ratio marqueur/résidus totaux	0.020	0.020	0.020	0.171	
LMR proposées (mg/kg de tissu)	0.008	0.008	0.008	0.025	
Consommation (kg/j)	0.100	0.010	0.300	0.090	
DITR (mg/j)	0.039	0.004	0.118	0.013	0.174
Consommation (% DJA)	22	2	66	7	97
	Coxidin®				
Ratio marqueur/résidus totaux	0.019	0.019	0.019	0.186	

LMR proposées (mg/kg de tissu)	0.008	0.008	0.008	0.025	
Consommation (kg/j)	0.100	0.010	0.300	0.090	
DITR (mg/j)	0.041	0.004	0.124	0.012	0.182
Consommation (% DJA)	23	2	69	7	101

4) La gestion du risque : le temps d'attente

Le temps d'attente est le délai minimum qui doit s'écouler entre la dernière administration du principe actif à un animal et le moment où les denrées provenant de cet animal peuvent être récoltées en vue de la consommation humaine

Il peut être calculé selon 2 méthodes : une approche empirique et une approche statistique.

a) Approche empirique

L'approche empirique consiste en l'abattage d'animaux après administration du principe actif (selon le schéma thérapeutique), et ce à plusieurs échéances. Pour chaque animal, les résidus dans les tissus sont dosés. Le temps d'attente sera défini comme étant la date d'abattage pour laquelle les concentrations en résidus dans les tissus de tous les animaux de l'échéance sont en dessous des LMR respectives. Une marge de sécurité est appliquée pour compenser la variabilité biologique. Cette marge est comprise entre 10 et 30%. Cependant, il n'existe pas de recommandations précises à ce sujet (CVMP, 1996).

b) Approche statistique

Le modèle de calcul pour la détermination statistique du temps d'attente est basé sur des principes pharmacocinétique (CVMP, 1996). L'élimination terminale des tissus d'un principe

actif est généralement décrite par un terme mono-exponentiel. L'équation de premier ordre de cette élimination est (Equation 1):

$$C(t) = C0 \times e^{-kt}$$

Équation 1

Où C_t est la concentration du principe actif au temps t, C_0 est la concentration au temps t=0 et k le constante d'élimination. Grâce à une transformation logarithmique, on peut vérifier si cette hypothèse est correcte : l'exponentielle devient une droite et une régression linéaire est possible pour calculer le temps d'attente. Cette régression linéaire nécessite des données indépendantes les unes des autres. Dans le cas de duplicates ou triplicates, la moyenne des mesures dans les échantillons est utilisée. De plus, toutes les échéances de la régression linéaire doivent avoir le même nombre de données pour éviter les biais.

L'omission des données sous la LOQ peut également être à l'origine d'un biais. C'est pourtant ce que préconise la FDA (Food and Drug Administration). Les instances de l'Union Européenne recommandent pour l'instant de les remplacer par la moitié de la valeur de la LOQ, car les observations de faibles concentrations sont réelles et doivent être prise en compte. Mais la prise en compte de ces données sous la LOQ est un problème débattu depuis de nombreuses années. Une mise à jour des guides de recommandation sera effective en 2016, dans laquelle plusieurs techniques seront discutées, comme l'approche de maximum de vraisemblance, une simulation des données ou l'utilisation des données « comme mesurées » (EMA, 2013).

3 échéances de temps sont nécessaires pour permettre une régression linaire significative. Théoriquement, un nombre minimal de 3 animaux lors de chacune des 3 échéances est requis. Cependant, suivant les espèces étudiées, un nombre plus grand est recommandé (de 4 à 10 animaux par échéance).

Pour pouvoir procéder à la régression linéaire, il est nécessaire de vérifier certaines hypothèses (Concordet and Toutain, 1997) :

- Absence d'incertitudes expérimentales c'est-à-dire que la précision des variables indépendantes (temps d'abattage des animaux) doit être meilleure que la précision des variables dépendantes (concentrations des résidus)
- Indépendance des données : pour cela, il doit y avoir autant d'animaux utilisés que de données observées.
- Homogénéité des variances des données transformées (logarithmiques). Celle-ci peut être vérifiée en employant des tests statistiques comme le test de Bartlett (FDA) ou le test de Cochran (CVMP).
- Linéarité des données transformées (logarithmiques) en fonction du temps : le plus souvent, une observation visuelle du graphique est suffisante mais pour une assurance statistique, un test de lack-of-fit peut être réalisé. Si une déviation est observée lors des premières échéances, celle-ci peut être due au processus de distribution du principe actif qui n'est pas encore terminé. Ces points doivent alors être exclus. Une déviation observée lors des dernières échéances peut être due à des concentrations sous la LOQ. La cinétique de déplétion ne peut pas être observée lors de ces échéances : il est alors justifié de les omettre.
- Distribution selon une loi normale des erreurs résiduelles (différences entre les valeurs observées et prédites par la régression linéaire). Un test de Shapiro-Wilk peut être réalisé, même si un test visuel est suffisant (résidus en fonction de leur fréquence de distribution).

En Europe, le temps d'attente est défini comme étant la limite supérieure de l'intervalle de tolérance à 95% dans laquelle les teneurs résiduelles sont inférieures aux LMR avec un intervalle de confiance de 95%. En d'autres termes, le temps d'attente est défini par une probabilité caractérisant un risque (5%) d'avoir 5% des animaux dont les teneurs résiduelles sont supérieures à la LMR. Ce temps d'attente est calculé par régression linaire sur la pente finale d'élimination de chaque type de denrée (lait, œuf, miel, viande et abats) (Figure 4).

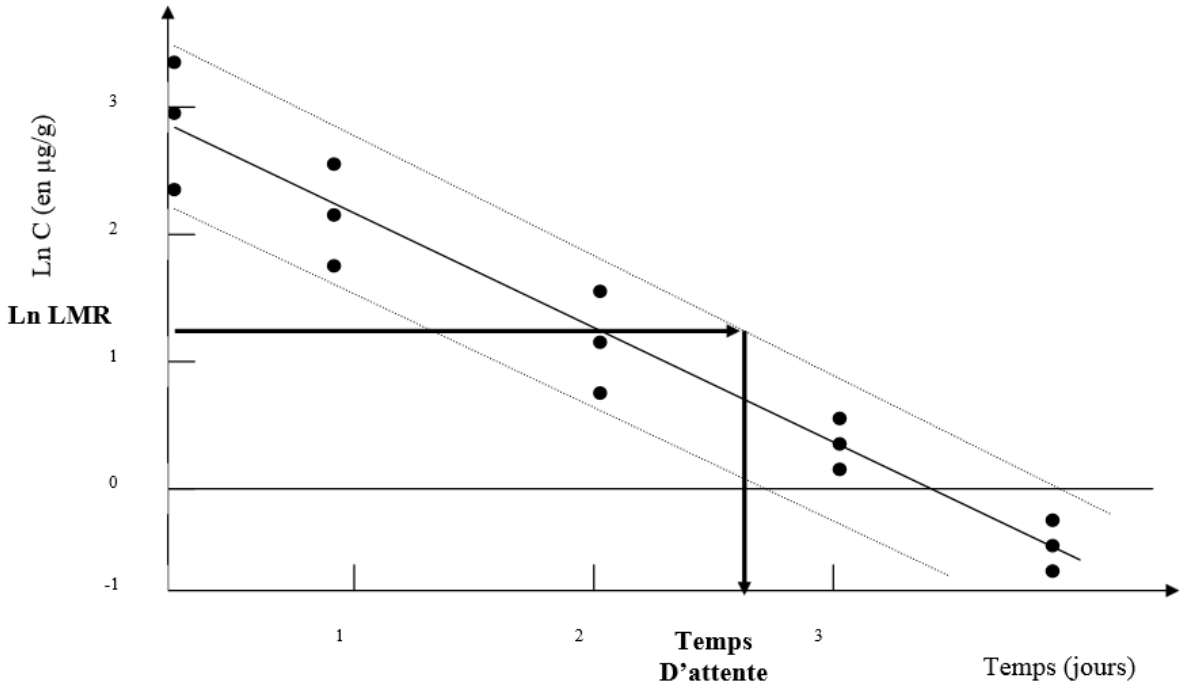


Figure 4 : graphique représentant le calcul du temps d'attente d'après (Henri, 2008)

Ce calcul peut être fait avec l'équation de Stange (Stange, 1970). Le temps d'attente retenu pour la spécialité dans l'espèce donnée sera celui de la denrée où le résidu s'élimine le plus lentement, arrondie au jour supérieur si le temps ne correspond pas à un jour entier. Le temps d'attente pour les 2 spécialités à base de monensin est fixé à un jour, c'est-à-dire que l'alimentation supplémentée en monensin doit être arrêtée un jour avant l'abattage, et remplacée par une alimentation neutre.

Le temps d'attente est un paramètre crucial, pour l'éleveur, l'animal et le consommateur. Un temps d'attente trop long obligera l'éleveur à conserver les volailles plus longtemps dans ses locaux et à les nourrir, engendrant des pertes économiques. Pour l'animal, si le temps d'attente est trop long, il sera plus à risque de développer une coccidiose, n'étant plus sous l'effet de la molécule. Mais un temps d'attente trop faible exposera le consommateur à des doses non négligeables du médicament ou de l'additif alimentaire. Il est donc primordial d'estimer au mieux ce temps d'attente. La PBPK, de par son principe même, permet la prédiction des concentrations d'une molécule dans les tissus et l'extrapolation entre espèce ou sur différentes périodes de la vie. C'est donc également un outil de choix pour un calcul

innovant des temps d'attente, en l'associant à des outils statistiques permettant d'étudier la variabilité autour du modèle.

D. La PBPK comme outil d'étude des résidus

1) La pharmacocinétique

La pharmacocinétique est l'étude du devenir d'un principe actif dans l'organisme. Elle s'attache à décrire les phénomènes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion. Ces 4 phases sont regroupées sous le sigle ADME. Différentes méthodes existent pour quantifier ces 4 phases : la pharmacocinétique non-compartimentale (NCA), la pharmacocinétique compartimentale, la pharmacocinétique de population et la pharmacocinétique basée sur la physiologie.

a) La pharmacocinétique non-compartimentale

La pharmacocinétique non compartimentale (NCA pour Non Compartmental) est une méthode de calcul purement descriptive des paramètres pharmacocinétiques. Il s'agit de travailler uniquement sur les données observées, sans tenir compte des hypothèses nécessaires à la modélisation. A partir de ces données, il est possible de calculer des paramètres tels que la clairance du principe actif (coefficient de proportionnalité entre le taux de disparition du principe actif et sa concentration), le volume de distribution… Il est également possible de quantifier l'exposition au principe actif par calcul de l'aire sous la courbe (AUC : Area Under the Curve) par la méthode dite des trapèzes (*Figure **5***).

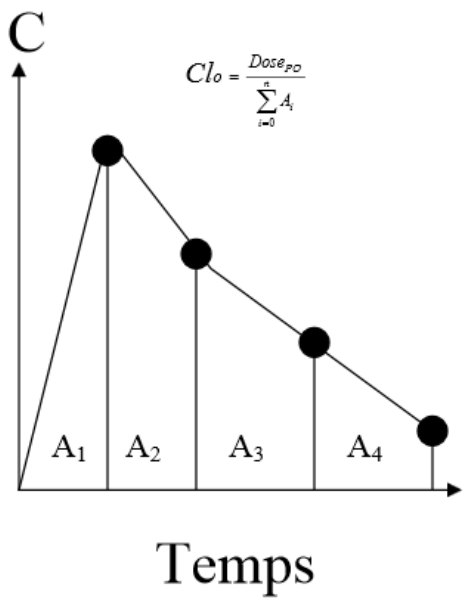


Figure 5 : Calcul de l'AUC par la méthode des trapèzes, d'après (Gabrielsson and Weiner, 2001)

Comme illustré sur la figure 5, l'aire sous la courbe est donc la somme des aires du triangle A1 et des trapèzes A2, A3 et A4. A partir de l'AUC, il est possible d'obtenir des paramètres pharmacocinétiques, comme la clairance, qui sera égale au rapport entre la Dose administrée et l'AUC qui en résulte (Equation 2).

$$Cl = \frac{Dose}{AUC}$$

Équation 2

La méthode non-compartimentale permet donc *a posteriori* de décrire des phénomènes pharmacocinétiques, éventuellement de les corréler à la pharmacodynamie (qui est la science complémentaire à la pharmacocinétique puisqu'elle étudie les effets des principes actifs sur l'organisme).

b) La pharmacocinétique compartimentale

La pharmacocinétique compartimentale utilise des modèles mathématiques pour décrire les données observées. Un modèle est une représentation simplifiée (donc pas nécessairement exacte) de la réalité. L'organisme est vu comme étant composé de compartiments (volume au sein duquel le principe actif a un comportement homogène), chacun représentant une région non-spécifique de l'organisme (où le comportement du principe actif est le même). La représentation est donc réaliste d'un point de vue cinétique mais pas réaliste biologiquement. Ces compartiments sont des entités théoriques qui permettent la formulation de modèles mathématiques pour décrire le comportement chimique du principe actif en fonction du temps tout en respectant les mouvements entre les compartiments et à l'intérieur de ceux-ci (Riviere, 2011). Le modèle le plus simple n'est composé que d'un seul compartiment, dans lequel une dose est administrée puis progressivement éliminée. Une flèche orientée vers le compartiment symbolisera l'entrée (dose administrée) et une flèche qui part du compartiment représentera la sortie. A partir de ce compartiment unique, il est possible de lui greffer des compartiments périphériques. Chacun d'entre eux sera relié à un autre compartiment par des flèches qui symboliseront les transferts de principe actif (Figure 6).

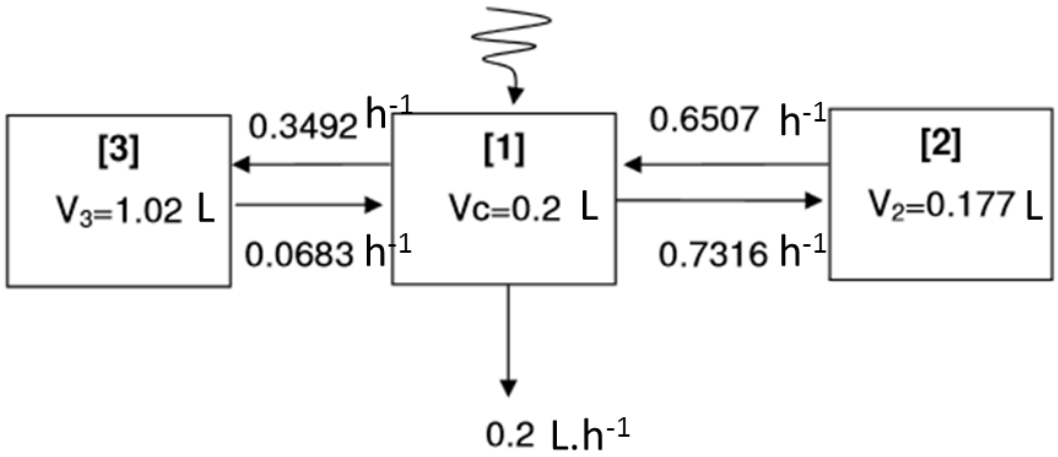


Figure 6 : Exemple d'un modèle à 3 compartiments, un compartiment central [1] à partir duquel se font l'entrée et la sortie du principe actif et deux compartiments périphériques, l'un à équilibre rapide [2] et l'autre à équilibre plus lent [3].

Ils sont très largement utilisés en pharmacocinétique (Toutain, 2007) car:

- Ils sont simples
- Ils sont définissables à partir des données plasmatiques : le sang étant un liquide biologique facilement accessible lors des expérimentations
- Ils répondent à un besoin majeur de la pharmacocinétique : la définition et l'adaptation des schémas posologiques
- Les concentrations plasmatiques sont, en règle générale, en équilibre avec les concentrations au niveau de la biophase (site d'action). Une corrélation avec la pharmacodynamie est donc possible.
- Il est possible de décrire la plupart des données observées par une suite d'exponentielles (dans le cas de la pharmacocinétique linéaire) : on peut donc les représenter par un modèle compartimental.

c) La pharmacocinétique de population

La pharmacocinétique de population, également appelée régression non linéaire à effet mixte, consiste à analyser simultanément, à l'aide de modèles mathématiques et statistiques, les données issues de plusieurs individus. Il est possible de travailler aussi bien sur des données éparses (peu de prélèvements par sujet) que sur des données riches (beaucoup de prélèvements par sujet) : il s'agit là d'un avantage considérable de la pharmacocinétique de population, puisqu'on ne peut réaliser de modélisations individuelles avec les modèles classiques compartimentaux qu'avec des données riches. L'important est que l'ensemble du comportement du principe actif soit décrit par tous les prélèvements réalisés sur tous les individus.

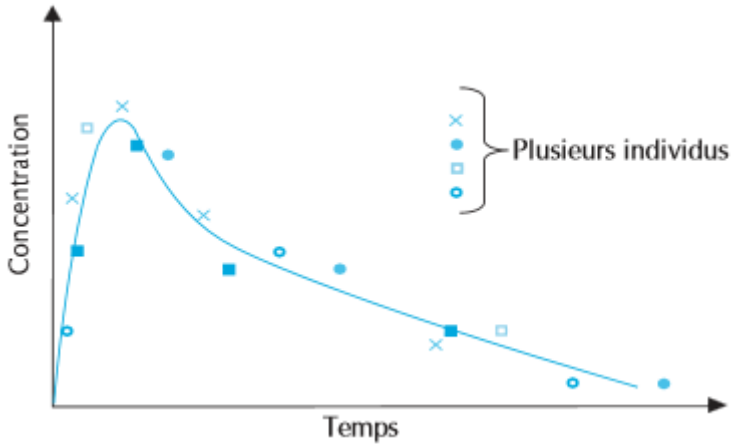


Figure 7 : Prélèvements chez plusieurs individus pour une étude de pharmacocinétique de population, d'après (Simon et al., 2005)

Par cette méthode, le modèle est d'autant plus fiable que le nombre d'individus et de prélèvements par individu est important. Ainsi, chaque paramètre pourra être décrit avec une moyenne et une variabilité inter-individuelle associée (Riviere, 2011). Ensuite, on pourra rechercher des covariables qui expliqueront une partie de la variabilité inter-individuelle. L'exemple type est celui d'un principe actif éliminé par les reins. Un des mécanismes mis en jeu est la filtration glomérulaire. Le marqueur le plus utilisé pour estimer cette filtration est la concentration plasmatique de la créatinine, un déchet organique qui n'est éliminé de l'organisme que par filtration. Si un individu a une forte concentration de créatinine dans son plasma, cela peut avoir pour origine une filtration glomérulaire moins performante que la normale. On peut alors logiquement penser qu'un principe actif éliminé par cette voie sera également moins bien éliminé. On cherchera donc une corrélation entre la concentration de la créatinine (ou sa clairance) et la clairance du principe actif. Ainsi, plusieurs covariables peuvent être étudiées, dans le but d'expliquer la variabilité inter-individuelle. Même s'il est tentant de construire un modèle avec beaucoup de covariables, il ne faut pas oublier que l'intégration de celles-ci fait l'objet d'une hypothèse : aucune covariable ne peut décrire parfaitement un paramètre pharmacocinétique. L'intégration des covariables fait l'objet d'un risque statistique : on peut voir un lien entre une covariable et un paramètre pharmacocinétique là où la relation n'est due qu'au hasard (Simon et al., 2005). Il faut donc appliquer le principe de parcimonie qui est le rasoir d'Ockham de la pharmacocinétique : les multiples ne doivent pas être utilisés sans nécessité.

La pharmacocinétique de population est surtout utilisée pour le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) des patients (Simon et al., 2005). Lorsqu'un modèle pharmacocinétique de population est validé, il est possible de proposer une adaptation individuelle des doses, en se basant sur le théorème de Bayes. En connaissant les paramètres associés au modèle et la dose prescrite au patient, il est possible avec quelques prélèvements (2-3) de calculer les paramètres du patient. Ensuite, plusieurs schémas thérapeutiques seront simulés en prenant en compte ces paramètres, et le plus approprié sera proposé au patient.

Un modèle de pharmacocinétique de population a été développé dans la fin des années 1990 pour expliquer la variabilité inter-individuelle des concentrations de gentamicine chez le cheval (Martin-Jimenez et al., 1998). Il a été démontré que la majorité de la variabilité était expliqué par les différences de poids et de concentration sérique en créatinine.

2) Historique et principes de la PBPK

La pharmacocinétique basée sur la physiologie est une variante de la pharmacocinétique compartimentale, approche très utilisée du fait de sa simplicité. Mais cette approche compartimentale est purement mathématique et offre une représentation très simpliste de l'organisme. Il s'agit de modèles dit « Top-down », c'est-à-dire que le modèle est construit à partir de données observées, et n'est valable que pour ces données. A la différence de la PBPK, modélisation « Bottom-up », dont l'élaboration et la modification du modèle permet de décrire les données observées (Zhao et al., 2012). Pour cela, les modèles PBPK incorporent des informations physiologiques spécifiques à l'espèce étudiée ainsi que des informations biochimiques spécifiques au composé d'intérêt. L'organisme est ainsi schématisé en un ensemble de compartiments, représentant chacun un organe (ou un ensemble d'organes) étudié, reliés entre eux non plus par des constantes de transfert, mais par les débits de perfusion de ces organes. Ainsi, avec cette nouvelle approche, il est possible en modifiant les conditions initiales, comme les modalités d'exposition (voie d'administration, dose, durée) ou les constantes physiologiques (changements d'espèce), de prédire les nouvelles concentrations de la molécule étudiée.

Les modèles PBPK sont utilisés depuis 85 ans pour comprendre la distribution des composés chimiques dans l'organisme (Andersen, 1995). Le développement des modèles PBPK date

des années 1930 avec les travaux de Teorell en Suède. Il décrivait alors les facteurs gouvernant la distribution d'un principe actif en détail, ainsi que les équations différentielles de transfert de masse (Teorell, 1937a; b). Cependant, il ne disposait pas des outils informatiques d'aujourd'hui pour résoudre ces systèmes d'équations différentielles. Cette stagnation dura jusqu'aux années 1960 où l'essor de l'ère informatique a réveillé l'intérêt pour cette branche de la pharmacocinétique. A partir de cette époque, la PBPK a été utilisé par les industries pharmaceutiques dans (1) l'aide à la sélection précoce des candidats (2) la réduction des tests sur les animaux (3) l'identification précoces des paramètres clés (4) l'aide au design des essais cliniques et (5) l'extrapolation inter-espèces, des doses et des voies d'administration (Rowland et al., 2004).

La PBPK est aussi utilisée dans les institutions publiques, en particulier dans l'évaluation du risque. Un exemple est l'évaluation du risque potentiel des dérivés de l'acide rétinoïque, dont l'apport des modèles PBPK a aidé quant à la prise des décisions des agences de réglementation. Au début des années 1990, l'acide trans-rétinoïque était à l'étude pour son usage pour la peau photo-endommagée. Le directeur du centre pour l'évaluation des médicaments et de la recherche de la FDA (CDER) a demandé au promoteur d'évaluer, en utilisant un modèle PBPK, l'exposition fœtale potentielle à la rétinine-A appliqués par voie topique sur la peau des femmes en âge de procréer. Sachant que la rétinine-A est hautement tératogène (environ 40 fois plus que le Thalidomide®) et que 10% de la dose appliquée sur la peau est absorbée, la FDA a demandé la confirmation que l'exposition fœtale et les potentiels effets tératogènes n'apparaitrait pas durant l'usage clinique. La PBPK était alors la seule méthode rationnelle et éthique de détermination du risque. Suite à cet épisode, la FDA encourage les promoteurs à utiliser la PBPK durant le développement des médicaments, dans le but de faciliter et d'améliorer les capacités de prédictions, de progresser dans la compréhension pour fournir une meilleure prise de décision réglementaire (Rowland et al., 2004).

3) La PBPK en pharmacologie vétérinaire

En pharmacologie vétérinaire, la PBPK est utilisée avec 2 objectifs principaux : la recherche d'un schéma thérapeutique optimal avec la détermination des concentrations d'un principe actif au niveau de la biophase (site d'action de la molécule), ainsi que l'étude de sa

distribution et de sa déplétion dans les tissus destinés à la consommation, afin par exemple de fixer des temps d'attente pour la protection de la santé des consommateurs (Chapel and Sanders, 1996). En effet, comme nous l'avons vu, par l'incorporation de paramètres physicochimiques et physiologiques, les modèles PBPK ont la capacité de prédire les concentrations, quelle que soit la voie d'administration et l'espèce considérée (Clewell 3rd et al., 2000). Les modèles PBPK ont donc une utilité pour prédire les concentrations en cas de non-respect des posologies ou pour la prédiction chez des espèces d'intérêt économique mineur.

La PBPK est beaucoup utilisé en pharmacologie vétérinaire pour ses capacités d'extrapolation, quelle que soit la dose, la voie d'administration et l'espèce (Wang et al., 2000). Si l'étude principale est réalisée sur un animal d'une espèce majeure, le modèle associé peut être modifié (remplacement des paramètres physiologiques). Pour le reste des paramètres, il peut être fait l'hypothèse que les animaux sont suffisamment proches pour que les changements soient minimes (Travis et al., 1990). Cependant, si une différence est connue, comme par exemple un métabolisme différent, ces données peuvent être prises en compte.

Dans le cas des espèces à croissance rapide, il est possible que les valeurs initiales des paramètres du modèle ne correspondent pas à celles que l'on devrait retrouver à la fin de l'expérimentation. Pour pallier cette éventualité, il peut être mis en place des équations d'allométries dans le modèle. On considère alors qu'un paramètre n'est plus fixe, mais varie en fonction de la masse de l'animal comme pour les volumes des organes par exemple (Gould, 1966).

4) Représentation du modèle

a) Le diagramme

Le diagramme d'un modèle PBPK est multi-compartimental. Dans chaque compartiment d'intérêt sont renseignés les paramètres utilisés dans le modèle, qu'ils soient anatomiques/physiologiques ou biochimiques. Cet enchaînement de compartiment représente l'organisme de l'animal entier, il est donc important de placer les compartiments

et de les relier comme les organes le sont chez l'animal vivant : chaque compartiment du diagramme a donc un équivalent physiologique, qui n'est pas forcément un organe seul mais peut être un regroupement d'organes, on parle alors de lumping (Nestorov et al., 1998). Chaque compartiment est en théorie composé d'un ensemble de 3 sous-compartiments : l'espace vasculaire dans lequel circule le sang d'irrigation, qui communique avec l'espace intercellulaire, lui-même relié au milieu intracellulaire qui est le lieu d'action du principe actif (Mordenti, 1986). Au sein de chaque sous-compartiment, le principe actif est uniformément réparti. A ce niveau, 2 options s'offrent au modèle :

- Si les échanges entre les sous-compartiments sont très rapides, le débit d'irrigation du compartiment est le facteur limitant : le modèle est perfusion-limitant, et les 3 sous-compartiments sont regroupés en un seul compartiment.
- Si le transfert entre deux sous-compartiments est le facteur limitant, le modèle est dit perméabilité-limitant. 2 sous-compartiments pourront être fusionnés mais il y aura toujours une séparation dans le compartiment.

b) Relations mathématiques et mécanismes d'ADME

Les différents processus qui ont lieu dans un compartiment sont représentés par une équation différentielle. Cela inclut les transferts de masse et les mécanismes intra-tissulaires. La conservation de la matière (loi d'action de masse) est un principe premier de la PBPK et sera appliquée à la molécule d'intérêt, ainsi qu'à ses métabolites s'ils sont étudiés. Un contrôle de la loi d'action de masse fait partie des bonnes pratiques de la PBPK (Loizou et al., 2008) : à tout moment, la somme des quantités dans l'organisme et des quantités éliminées doit être égale à la dose administrée. Le mécanisme de base de passage d'un compartiment à un autre est la diffusion passive selon le gradient de concentration, de la plus forte concentration vers la plus faible (Labaune and Wepierre, 1984). Des mécanismes actifs peuvent s'ajouter à ce mécanisme de base. La vitesse de diffusion dans un compartiment suit la loi d'action de masse de Fick, selon l'équation différentielle suivante d'ordre 1 (Ramsey and Andersen, 1984) (Equation 3):

$$\frac{dA}{dT} = K \times (\frac{Centrée - Csortie}{V})$$

Équation 3

où *dA/dT* représente la variation de la quantité du principe actif en fonction du temps, *K*, $C_{entrée}$, C_{sortie} et *V* représentent respectivement la constante de vitesse de transfert, la concentration entrante dans le compartiment (=concentration artérielle), la concentration sortante du compartiment (=concentration veineuse) et le volume du compartiment. Dans le cas des modèles perfusion-limitant, la constante de vitesse *K* sera remplacée par le débit d'irrigation du compartiment *Q*.

Les transferts vers le compartiment ne sont pas uniquement liés à la physiologie. Les paramètres biochimiques du principe actif, par l'intervention du coefficient de partage, jouent aussi un rôle dans ces transferts. Le coefficient de partage *Kp* représente l'affinité du tissu pour le principe actif. Il est calculé selon le rapport concentration tissulaire/concentration plasmatique (Equation 4).

$$Kp = \frac{Ct}{Cp}$$

Équation 4

Pour les modèles perfusion-limitant, la concentration libre tissulaire est égale à la concentration libre plasmatique : l'équation 3 peut alors s'écrire sous la forme de l'Equation 5 :

$$\frac{dA}{dT} = Q \times (Centrée - \frac{Ct}{Kp})$$

Équation 5

Ensuite, pour avoir la variation des concentrations en fonction du temps, il suffira de diviser la quantité de principe actif *dA/dT* par le volume *V* de l'organe associé.

Cette équation sert de base pour tous les compartiments non-émonctoires, à condition que les transferts qui les gouvernent soient d'ordre 1. Pour les organes émonctoires, une clairance sera ajoutée à l'équation précédente.

En fonction des mécanismes d'élimination, les équations pourront être d'ordres différents, les processus d'ordre 1 étant souvent prépondérants car l'élimination est dépendante de la quantité présente dans le compartiment. Mais on pourra également faire intervenir une élimination saturable, représentée par une équation de Michaelis-Menten.

c) Les paramètres utilisés

Le modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie sera donc dépendant de 3 séries de paramètres :

- Physiologiques : propres à chaque compartiment donc à chaque organe (ou regroupement d'organes), comme son poids ou son volume : on considère que la densité des organes est proche de 1, allant de 0.9 pour la graisse (Mendez and Keys, 1960) à 1.06 pour les muscles (Ross et al., 1991) ; son débit d'irrigation (Distribution) et sa composition. Ces paramètres, mesurés sur l'animal ou issus de la littérature, peuvent être fixés ou reliés au poids corporel par des équations d'allométrie.
- Physicochimiques : propres à la molécule d'intérêt, comme son poids moléculaire, pka, logP.
- Biochimiques : liés à l'interaction de la molécule et du sujet d'étude, ils sont liés au processus d'ADME. Parmi eux on trouve, l'Absorption avec la constante d'absorption et la biodisponibilité ; la Distribution avec la fixation aux protéines plasmatiques et les coefficients de partage ; le Métabolisme avec des paramètres décrivant la biotransformation ; l'Excrétion avec les clairances correspondantes.

Il est possible de remplacer les paramètres physiologiques d'une espèce animale par ceux d'une autre, afin d'extrapoler les profils pharmacocinétiques : il s'agit là de l'avantage principal de la PBPK. Cependant, les paramètres biochimiques pouvant varier d'une espèce à une autre, nécessiteront probablement d'être adaptés car les tissus des espèces n'ont pas la même composition ce qui, au final, aura un impact sur tout le processus ADME.

5) PBPK et IVIVE

L'IVIVE, provenant de l'anglais « *in vitro*/*in vivo* extrapolation », permet, à partir de données issues d'études *in vitro*, l'extrapolation à la situation *in vivo* de paramètres d'intérêt. Cette extrapolation a souvent été décrite dans la littérature concernant la clairance hépatique. Nous allons décrire brièvement les étapes de cette extrapolation. La première étape consiste à déterminer sur du matériel biologique *in vitro* (cellules entières, microsomes, fractions S9, coupe d'organe etc., chaque méthode ayant ses avantages et inconvénients (Pelkonen and Turpeinen, 2007)) la clairance intrinsèque de la molécule. Ensuite, on applique des facteurs d'échelle (nombres de cellules, quantité de protéines microsomales…) pour remonter au gramme de tissu qu'il suffit de multiplier par le poids de l'organe en gramme (Barter et al., 2007). À ce stade, la clairance hépatique est décrite au niveau in vitro : il reste donc à lui appliquer un modèle de perfusion et de liaison aux protéines. Parmi les modèles les plus simples il existe 2 modèles qui ont pour hypothèses communes (i) la distribution débit-limitant dans le foie (sans barrière de diffusion) (ii) la métabolisation uniquement de la fraction libre et (iii) la distribution homogène des enzymes de métabolisation. Il s'agit des modèles dits « bien agités » « well-stired model » et « en tubes parallèles », qui diffèrent vis-à-vis du gradient de concentrations de la molécule dans le foie. Le modèle « well-stired » considère que le principe actif est réparti de façon homogène dans le foie alors que le modèle en « tubes parallèles » considère le foie comme un ensemble de tubes. Pour franchir le foie, le principe actif doit cheminer le long d'un tube, d'où il est progressivement éliminé : il se met alors en place un gradient de concentration dans ce modèle. Les équations de ces modèles sont décrites ci-dessous (Equations 6 et 7): CL_{hep}, Q_H, fu et CL_{int} représentent respectivement la clairance hépatique *in vivo*, le débit hépatique, la fraction libre de la molécule et la clairance intrinsèque du foie déterminée *in vitro* (Houston et al., 2012):

$$CL_{hep} = \frac{\mathrm{Q_H} \times fu \times CL_{int}}{\mathrm{Q_H} + fu \times CL_{int}}$$

Équation 6 : modèle « well-stired »

$$CL_{hep} = Q_H \times (1 - e^{\frac{-fu \times CL_{int}}{Q_H}})$$

Équation 7 : modèle en tubes parallèles

6) Exploitation d'un modèle PBPK

a) Simulation et validation du modèle

La simulation du modèle consiste en la prédiction des concentrations de la molécule étudiée, ainsi que celles de ses métabolites éventuels, grâce au modèle PBPK que l'on a développé précédemment. Ces prédictions se font à l'aide de logiciels de simulations plus ou moins dédiés qui vont permettre la résolution numérique du système d'équations différentielles établi (Zhao et al., 2012):

- Des logiciels dits en « boîte noire » tels que SimCYP® ou GastroPlus®, où les équations sont pré-implémentées et où l'on renseigne les valeurs de paramètres (avec éventuellement la variabilité associée). Ces logiciels dédiés à la PBPK possèdent une grande bibliothèque de données physiologiques, animales ou humaines avec une description très détaillée de l'organisme.
- Des logiciels généralistes où l'on construit intégralement le modèle avec les équations correspondantes, comme c'est le cas avec Matlab® ou acslXtreme®. Ces logiciels sont utilisés dans des domaines qui utilisent couramment des équations différentielles, tels que les sciences biopharmaceutiques, l'aéronautique, l'armement…

La validation du modèle est une étape incontournable, car elle permet d'évaluer l'exactitude du modèle. Grâce à cette validation, il est possible de savoir si les paramètres essentiels du modèle ont été identifiés et caractérisés (Chapel and Sanders, 1996) et permettent de décrire la cinétique du produit. La validation est effectuée sur un jeu de données indépendant de celui utilisé pour la construction du modèle, par diagnostic graphique et l'utilisation de tests statistiques sur la corrélation entre les concentrations prédites et les concentrations observées.

b) PBPK, incertitude et variabilité : analyses de sensibilité et simulations de Monte-Carlo

Il est connu et accepté que les informations générées par la Toxicocinétique et la Pharmacocinétique soient caractérisées par un haut degré de variations. Il existe deux grandes sources de variabilité dans les modèles PBPK : celle inhérente à la variabilité physiologique et pharmacologique dans une population et celle de la modélisation et de la simulation qu'on qualifie plutôt d'incertitude quand les données (observées, mesurées et enregistrées) sont insuffisantes ou non définies (Nestorov, 2001). La caractérisation de l'incertitude et de la variabilité est une part importante de la détermination du risque (Barton et al., 2007). Lorsque l'information est disponible et fiable, la variabilité inter-individuelle peut être étudiée à l'aide de simulations de Monte-Carlo mais lorsque celle-ci fait défaut (en cas d'incertitude), des moyens peuvent aider à la caractérisation de l'incertitude dans la modélisation PBPK : (i) la collaboration systématique d'équipes multidisciplinaires pour intégrer les composants déterministes (biologiques) et non-déterministes (statistique) du modèle (ii) l'utilisation de l'analyse de sensibilité, en particulier l'analyse globale de sensibilité dans laquelle tous les paramètres sont autorisés à varier dans une gamme de valeurs, ou dans une moindre mesure l'analyse locale de sensibilité, dans laquelle l'impact d'un seul paramètre est étudié à la fois et (iii) l'amélioration de la documentation de la structure du modèle, des valeurs de paramètres, et des données de manière à assurer la transparence et la reproductibilité des résultats de la modélisation PBPK (EPA, 2008).

Rappel des objectifs : La détermination réglementaire du temps d'attente impose la linéarité des données, ce qui provoque un biais de calcul. La PBPK, qui se base sur des équations de transfert de masse pour prédire les concentrations, permet d'éviter la transformation des données, ce qui constitue donc un avantage majeur. Pour cela, il va falloir développer un modèle, optimiser les paramètres dont la valeur est mal définie puis le valider afin de pouvoir quantifier les résidus après ingestion d'un anticoccidien comme le monensin (détermination du risque). On pourra ensuite procéder à une analyse statistique du modèle, qui pourra servir à la détermination des temps d'attente (gestion du risque).

III. Partie Pratique

A. Matériel et méthode

1) Développement du modèle

a) Diagramme

Le modèle PBPK permettant de prédire les concentrations de monensin chez le poulet est un modèle débit-limitant développé sur le logiciel acslXtreme (3.0.2.1 ; AEgis Technologies Group Inc., Huntsville, AL, USA). Ce modèle est divisé en compartiments (Figure 8) décrivant le compartiment central (« Plasma »), le foie (« Liver »), la graisse (« Fat »), le muscle de la cuisse (« LegMuscle ») et le reste de l'organisme est divisé en deux compartiments, l'un lentement perfusé (« Poorly Perfused ») et l'autre rapidement perfusé (« Richly Perfused ») », qui représentent respectivement les organes pauvrement perfusés (ex : carcasse, plumes, muscles non décrits…) et richement perfusés (ex : rate, poumons…). Bien que les reins soient un organe d'intérêt dans le cadre d'une étude de résidus, ceux-ci ne sont pas représentés car comme nous le verrons plus tard nous ne disposons pas de mesures des concentrations rénales dans les études utilisées par manque d'une méthode analytique validée. Par souci de simplification, le compartiment «Crop» représente le jabot, l'estomac glandulaire et l'estomac musculeux (=gésier) ; le compartiment « Gut » quant à lui représente les intestins en général. Lors d'une administration orale, la molécule absorbée va

directement au foie, *via* le système porte pour arriver dans la circulation générale. Elle est ensuite distribuée à l'ensemble de l'organisme.

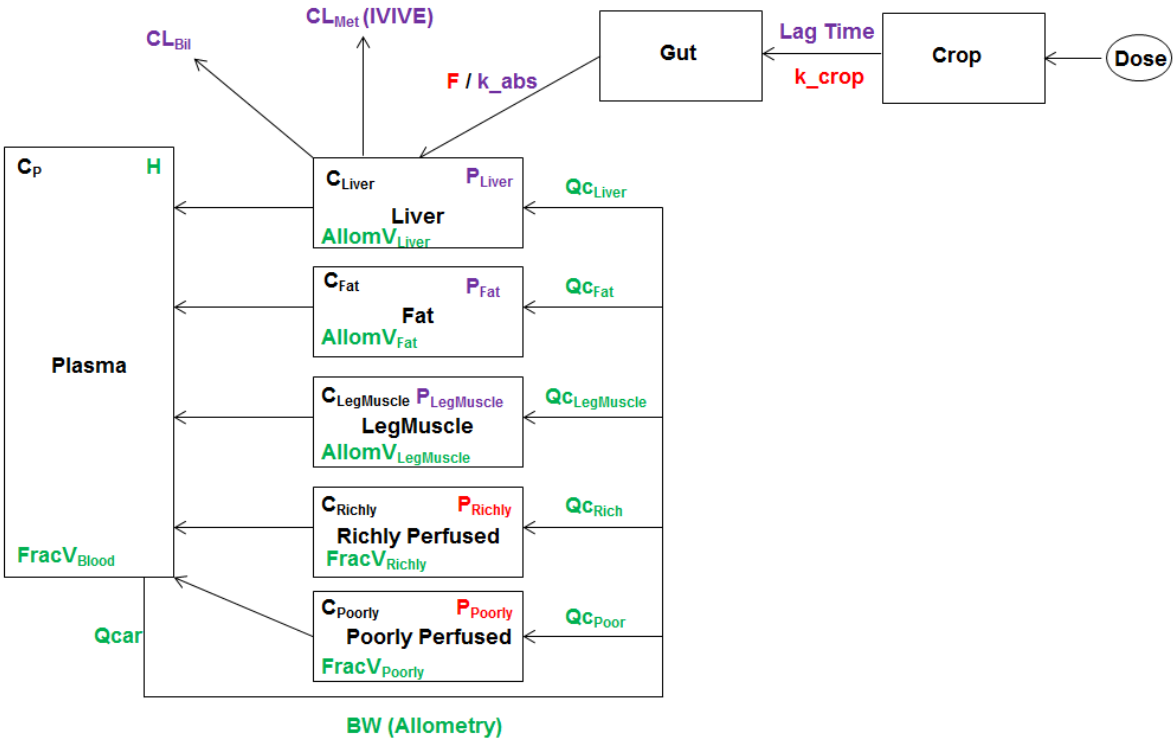


Figure 8 : Diagramme du modèle PBPK final, en vert les paramètres physiologiques, en violet les paramètres pharmacocinétiques et en rouge les paramètres qui seront ajustés.

b) Paramètres

Comme indiqué sur la Figure 8, la dose orale est introduite dans le compartiment « Crop » et passe ensuite vers les intestins avec un certain temps de latence (*LagTime*) dont la valeur est issue de la littérature (Henri, 2009) et une certaine vitesse de transfert (*k_crop*) qui sera ajustée. Ensuite la molécule est absorbée dans le foie selon sa constante d'absorption (*k_abs*) et sa biodisponibilité (*F*). Le foie est l'organe siège de l'élimination : une clairance totale (*WCLtot*) a été déterminée par Henri *et al.,* 2009. Selon Davison *et al.,* le monensin n'a ni clairance rénale, ni clairance pulmonaire. Le monensin excrété est largement retrouvé au sein des fientes et de la bile. La clairance totale a donc été fixée dans le modèle sur le foie. Puis cette clairance totale a été divisée en 2 clairances d'ordre 1, une métabolique calculée par IVIVE, à partir des paramètres déterminés par Henri et al., 2008 : la constante de

Michaelis *Km* et la vitesse maximum de métabolisation *Vmax*, décrivant la clairance intrinsèque *CLint*), le nombre de protéines microsomales par gramme de foie *(MPPGL, données du laboratoire*) et la fraction libre *Fu* (Atef et al., 1993). La clairance biliaire a été calculée par différence entre la clairance totale et la clairance métabolique.

Chaque compartiment est décrit par son volume (fraction du poids du poulet, $FracV_X$), son débit de perfusion (fraction du débit cardiaque, Qcar) et son coefficient de partition tissu/plasma, P_x (à l'exception du plasma décrit par son hématocrite, H). Les coefficients de partition sont également issus de la littérature (Henri, 2009) à l'exception de P_{Richly} et P_{Poorly} qui seront ajustés.

Les volumes de chaque compartiment proviennent soit de la littérature, soit d'équations d'allométrie. Le volume du compartiment « Richly Perfused » a été calculé à partir de la littérature (Cortright et al., 2009), en regroupant les masses d'organes richement irrigués, comme le cœur, les poumons, le cerveau, le tractus gastro-intestinal et la masse non mesurée. De cette façon le compartiment « Poorly Perfused », calculé par différence entre le poids du poulet et la somme du poids des autres compartiments, ne devrait contenir que la peau, les plumes et la carcasse.

Les débits d'irrigation proviennent uniquement de la littérature et sont exprimés comme étant une fraction du débit cardiaque. A partir de la différence entre le débit cardiaque (Qcar) et la somme des (fractions de) débits d'irrigation du foie (FracQcLiver), de la graisse (FracQcFat) et du muscle de la cuisse (FracQcLegMuscle), il a été déterminé un débit d'irrigation restant. L'hypothèse a été faite de diviser le débit restant en 3/4 pour le compartiment rapidement perfusé (FracQcRichly) et 1/4 pour le compartiment lentement perfusé (FracQcPoorly). Cette répartition, plus ou moins empirique, du débit restant est parfois retrouvée dans la littérature (Haddad et al., 1998).

En élevage, le monensin est administré aux poulets dès leur éclosion : le modèle prend donc en compte cette exposition tout au long de leur vie avec des équations d'allométrie sur leur poids, la croissance de leurs organes et leur ingéré alimentaire journalier. Les équations suivantes (Equations 8 et 9) proviennent du laboratoire de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Nouzilly (37), et ont été élaborées à partir des données des sélectionneurs :

$$BW = BWEnd * \left(\frac{BWEnd}{BWBegin}\right)^{\frac{-e^{-Bgomp(AgeEnd-AgeBegin)}-e^{-Bgomp(\frac{T}{24}-AgeBegin)}}{1+e^{-Bgomp(AgeEnd-AgeBegin)}}}$$

Équation 8 : Allométrie du poids du poulet

Où *BW* est le poids du poulet au temps *T (en jour)*, *BWBegin* le poids au début de notre étude (*AgeBegin*), *BWEnd* le poids à la fin de notre étude (*AgeEnd*), *Bgomp* le facteur de Gompertz. Cette fonction de Gompertz est représentée ci-dessous avec la figure 9 :

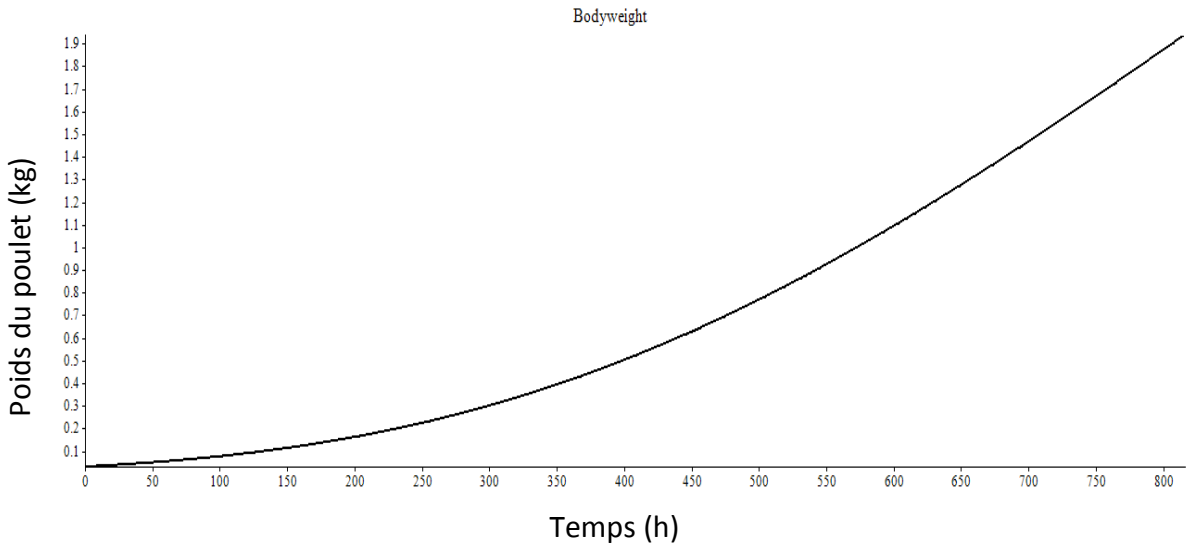


Figure 9 : Courbe de croissance des poulets sur 34 jours

Les organes pour lesquels les données étaient disponibles font également l'objet d'une allométrie. Il s'agit du foie, de la graisse et des muscles de la cuisse, selon l'équation suivante :

$$FracVx = e^{slope_x * \log(BW) + intercept_x}$$

Équation 9 : Allométrie de la croissance des organes

Où *FracVx* représente la fraction (volume organe x / BW), *slope_x* et *intercept_x* sont respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine de la corrélation entre le volume de l'organe x et le poids du poulet (*BW*).

Les données des allométries des organes sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	Slope	Intercept
Liver	0.868	-3.673
Fat	1.188	-3.928
LegMuscle	1.071	-1.965

Tableau 10 : Données des allométries des organes

Le monensin sera administré dans le modèle selon 2 schémas : (i) une dose unique orale (de monensin en solution) *WPODOSE* indexée sur le poids ou (ii) une administration orale continue et quotidienne durant les périodes d'éclairage du bâtiment d'élevage (« perfusion orale »), qui mimera l'ingestion de l'aliment supplémenté. L'exposition sera dépendante de la supplémentation en monensin de l'aliment (*feed_suppl_level*) et de la prise alimentaire du poulet (*feed_intake*) calculée selon l'équation d'allométrie suivante :

$$feed_intake = a_{feed}(1 - e^{-b_{feed} * Poids})$$

Équation 10 : Allométrie de la prise alimentaire

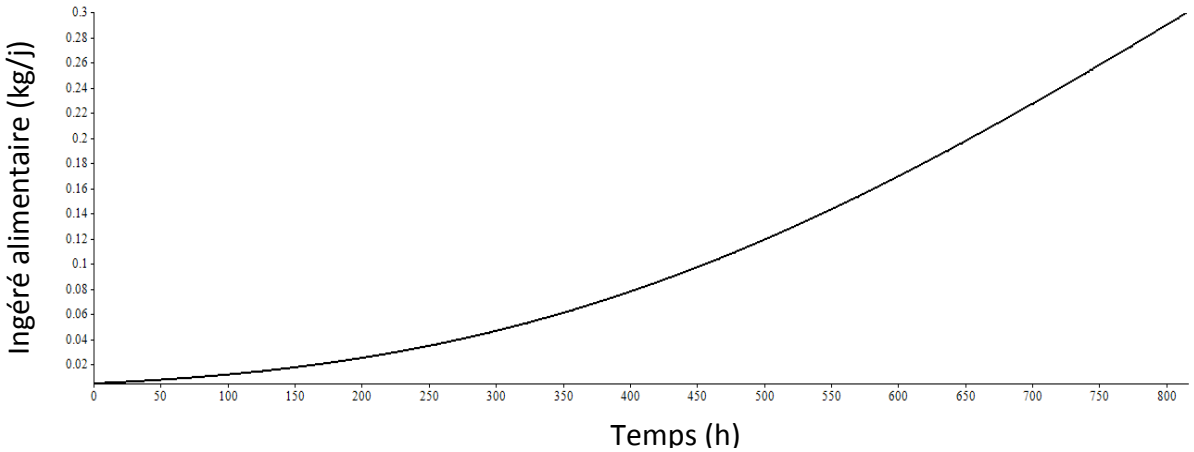


Figure 10 : Graphique de la quantité d'aliments ingérée par un poulet

L'ingéré alimentaire est indexé sur le poids du poulet : sa prise alimentaire nette croit avec son poids. De plus, les poulets ne mangent que lors des périodes d'éclairage, qui étaient de 20h par jour (dans les études utilisées, cf. les parties optimisation et validation du modèle). Une fonction « pulse » (pré-implémentée dans le logiciel *Figure **11***) a donc été utilisée, comprenant les paramètres *TreatmentStart* (heure de 1ère administration), *LightingPeriod* (durée d'éclairage), et *PulseInterval* (cycle de de la fonction « pulse »). Basiquement, l'exposition commence à l'éclosion à T=0, dure 20h chaque jour et un nouveau cycle d'exposition recommence toutes les jours (24h) : la journée se compose alors en 20h d'éclairage (donc d'exposition) et de 4h de nuit (sans exposition) où les concentrations en monensin peuvent décroitre.

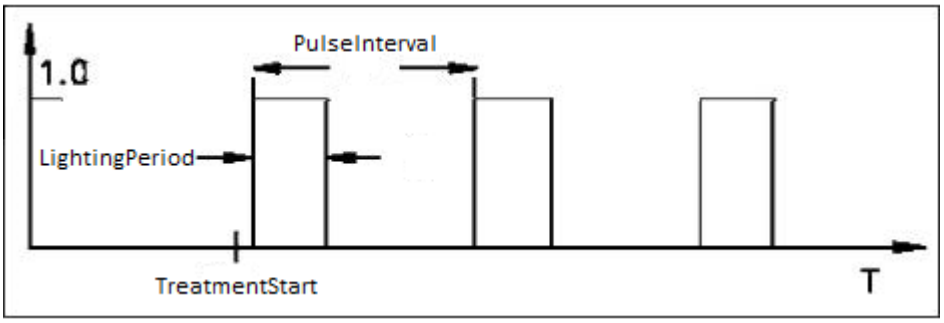


Figure 11 : Représentation de la fonction « Pulse » d'acslX®

c) Récapitulatif

L'intérêt majeur de ce modèle est que l'ensemble des paramètres suivants sont fixés (sans ajustement) grâce aux valeurs de la littérature et aux conditions d'élevage (et que très peu de paramètres seront ajustés), dont les valeurs sont résumés dans le tableau 11:

Tableau 11 : Valeurs des paramètres fixés dans le modèle

Nomenclature	Unités	Valeurs	Références
Paramètres pharmacocinétiques in vivo			
LagTime	h	0.25	(Henri et al., 2009)
F	%	29.91	(Henri et al., 2009)
K_abs	h^{-1}	3.85	(Henri et al., 2009)
P_Liver	Sans unité	0.83	(Henri et al., 2009)

P_Fat	Sans unité	3.39	(Henri et al., 2009)
P_LegMuscle	Sans unité	0.51	(Henri et al., 2009)
WCLtot	L/h/kg	2.17	(Henri et al., 2009)
Paramètres pharmacocinétiques de l'IVIVE			
Km	mM	28.6	(Henri et al., 2008)
Vmax	pmol/mg/min	646	(Henri et al., 2008)
fu	%	77.2	(Atef et al., 1993)
MPPGL	mg de protéines microsomales/ g de foie	9.31	Données du laboratoire
Paramètres physiologiques constants (par défaut de données d'évolution dans le temps)			
FracVBlood	%	6	(Yang et al., 2014)
H	%	33	(Yang et al., 2014)
Qcar	L/h/kg	12.5	(Wideman, 1999)
FracVRichly	%	8.8	(Cortright et al., 2009)
FracVPoorly	Volume restant		
FracQcLiver	%	25	(Cortright et al., 2009)
FracQcFat	%	1.5	(Cortright et al., 2009)
FracQcLegMuscle	%	11.55	(Cortright et al., 2009)
FracQcRichly	75% du débit restant		
FracQcPoorly	25% du débit restant		
Paramètres physiologiques de croissance			
AgeBegin	Jour	1	Sélectionneur
AgeEnd	Jour	35	Sélectionneur
BWBegin	Kg	0.04	Sélectionneur
BWEnd	Kg	2.04	Sélectionneur

Bgomp	Sans unité	0.0445516	Sélectionneur
Slope_liver	Sans unité	0.869	Sélectionneur
Intercept_liver	Sans unité	3.673	Sélectionneur
Slope_fat	Sans unité	1.118	Sélectionneur
Intercept_fat	Sans unité	3.928	Sélectionneur
Slope_legmuscle	Sans unité	1.071	Sélectionneur
Intercept_legmuscle	Sans unité	1.965	Sélectionneur
Paramètres de l'ingestion			
a_feed	Sans unité	266.2	Sélectionneur
b_feed	Sans unité	0.0005815	Sélectionneur
feed_suppl_level	µg de monensin/kg aliment	125000	(Henri et al., 2009)
TreatmentStart	h	0	(Henri et al., 2009)
LightingPeriod	h	20	(Henri et al., 2009)
PulseInterval	h	24	(Henri et al., 2009)

2) Optimisation du modèle

a) Obtention de K_crop, P_richly et P_poorly

Une première optimisation du modèle a été effectuée à partir d'une étude (Henri et al., 2009) en dose orale unique de monensin en solution. Pour les besoins de cet ajustement une version du modèle à poids constant a été utilisée après extraction des valeurs de paramètres correspondant à l'âge des poulets utilisés dans l'étude décrite ci-après. Brièvement, 32 poulets Ross, âgés de 29 jours (30 jours en fin d'étude), ont été utilisés, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture (exempts de monensin). Les poulets pesaient 1324 ± 13 g (moyenne±écart-type), ces valeurs correspondant approximativement aux valeurs de la courbe de croissance simulée.

Il a été administré aux poulets une dose de monensin de 4mg/kg par gavage. Les prélèvements sanguins ont été faits dans la veine alaire, selon les échéances suivantes (4 poulets par échéances) : 0, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, et 10h après l'administration. Puis les concentrations en monensin ont été déterminées par dosage en LC-MSMS selon la méthode

décrite dans Henri, 2009. Grâce à cette étude, les paramètres K_crop, P_richly et P_poorly ont pu être estimés pour que le modèle s'ajuste le mieux aux données observées, par un algorithme de maximum de vraisemblance (Nelder-Mead). Les valeurs initiales et les limites minimales et maximales des paramètres ont été fixées pour être physiologiquement possible. Tous les autres paramètres (dont la biodisponibilité trouvée lors de cette étude) avaient été fixés aux valeurs décrites dans la littérature (cf Tableau 11).

b) Obtention de la biodisponibilté du monensin dans l'aliment

Une fois ces trois derniers paramètres fixés, une deuxième optimisation du modèle a été effectuée avec les données de la seconde phase de l'étude de (Henri et al., 2009), réalisée avec des poulets nourri *ad libitum* pendant 33 jours avec de l'aliment supplémenté en monensin (125 mg/kg d'aliment). Le 32e jour, des prélèvements de sang et d'organes ont été réalisés sur des poulets à différents temps lors de cet état d'équilibre. Cela a permis d'estimer la biodisponibilité du monensin dans l'aliment. En effet, lors de l'étude « dose unique », le monensin était en solution et sa bioaccessibilité était donc complète. Mais lors de l'étude de résidus en « conditions terrain », le monensin était présent au sein de granulés. Le monensin nécessite alors une étape de digestion préalable de ces granulés pour être assimilé, ce qui diminue sa bioaccessibilité et *in fine* sa biodisponibilité. La nouvelle biodisponibilité a donc été estimée *via* l'algorithme de Nelder-Mead, en prenant en compte simultanément les concentrations dans le plasma, le foie, la graisse et les muscles de la cuisse de cette étude de résidus à l'état d'équilibre.

3) Validation du modèle

La validation a été réalisée par confrontation des simulations du modèle à un jeu de données indépendant (ce jeu de données n'a pas servi à l'élaboration du modèle). Il est issu de l'étude de déplétion des résidus de Henri et al., 2009 qui a suivi l'étude à l'état d'équilibre: les 60 animaux restant de l'étude *ad libitum* ont été utilisés pour la période de déplétion, qui consistait en une reprise de l'alimentation supplémentée en monensin pendant 6h (au retour de l'éclairage) puis passage à un aliment exempt de monensin lors du 34ème jour. Des

prélèvements de plasma, foie, graisse, muscles de la cuisse et du bréchet ont eu lieu à la fin de la période de nuit, puis 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 36h, et 72h après (6 animaux par échéance). Le bréchet n'a pas été pris en compte dans le modèle du fait de l'impossibilité d'estimer un coefficient de partition pour ce tissu car trop peu de concentrations étaient au-dessus de la limite de quantification dans l'étude de Henri et al., 2009 Afin de tester la validité du modèle, plusieurs analyses statistiques ont été effectuées :

- Une confrontation des données observées et prédites en fonction du temps, couplée à une étude de la variabilité de l'ingestion par 100 simulations de Monte-Carlo en faisant varier les paramètres a_feed, b_feed et F de la manière décrite dans le tableau 12 :

Tableau 12 : Variabilité des paramètres d'ingestion et de la biodisponibilité

-	Valeur	Coefficient de Variation(CV)	Distribution de probabilité appliquée	Origine du coefficient de variation
a_feed	266.2	10%	Normale	sélectionneur
b_feed	0.0005815	15%	Normale	sélectionneur
F (aliment)	3.88 % (voir résultats de l'optimisation)	50%	Normale	Empirique d'après (Hellriegel et al., 1996)

La variabilité des paramètres a_feed et b_feed nous a été fournie par l'INRA de Nouzilly d'après les données des sélectionneurs. La variabilité de la biodisponibilité a été affectée de manière empirique en se basant sur une étude de (Hellriegel et al., 1996), qui a regroupé les données de biodisponibilité de 149 composés. On observe dans cette étude une relation inversement proportionnelle entre la valeur de la biodisponibilité et sa variabilité associée (CV). Pour des composés ayant une biodisponibilité inférieure à 25%, le coefficient de variation se situe autour de 50%.

- Une étude de la corrélation (régression linéaire) entre les valeurs prédites par le modèle PBPK et les données observées.

- Une analyse des résidus standardisés après transformation logarithmique (du fait de l'hétéroscédasticité des concentrations)

4) Analyse de sensibilité

Une analyse locale de la sensibilité a été réalisée, afin de déterminer quels sont les paramètres les plus influents sur les concentrations estimées (dans toutes les matrices étudiées) sur la pente finale d'élimination (t=816h). Le coefficient normalisé de sensibilité (CNS), qui est calculé par l'équation ci-dessous, est utilisé pour distinguer l'importance relative des paramètres, où p est le paramètre étudié, Δp la variation du paramètre étudié, r est la variable de réponse (concentrations) et Δr la variation de la variable de réponse.

$$CNS = \frac{\Delta \mathrm{r}}{r} \times \frac{p}{\Delta \mathrm{p}}$$

Équation 11 : Coefficient normalisé de sensibilité

Un paramètre est considéré comme influent s'il est supérieur en valeur absolue à 0.25.

B. Résultats

1) Optimisation des paramètres

a) Dose unique de monensin en solution par voie orale

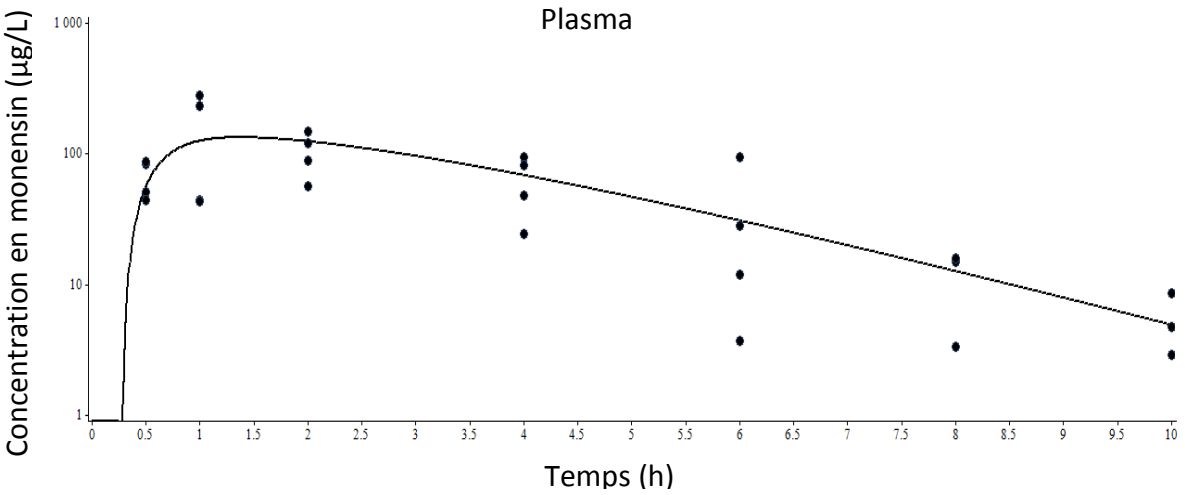


Figure 12 : Ajustement du modèle aux données plasmatiques observées (échelle logarithmique) lors d'une administration orale unique de monensin en solution; ligne continue : prédiction ; points : données observées

L'ajustement du modèle PBPK (à poids constant) décrit parfaitement les données observées lors d'une administration orale unique de monensin en solution (Figure 12). En effet, le modèle passe par l'ensemble des points observés (4 par échéance). Pour l'échéance à 8h, une donnée est omise car inférieure à la limite de quantification (2.5 µg/L). Les paramètres *k_crop*, *P_Richly* et *P_Poorly* ont pu ainsi être optimisés. Le *k_crop* a atteint une valeur finale 0.63 h^{-1}. Quant aux *P_Richly* et *P_Poorly*, ils ont convergé respectivement à 1.28 et 1.43.

b) État d'équilibre

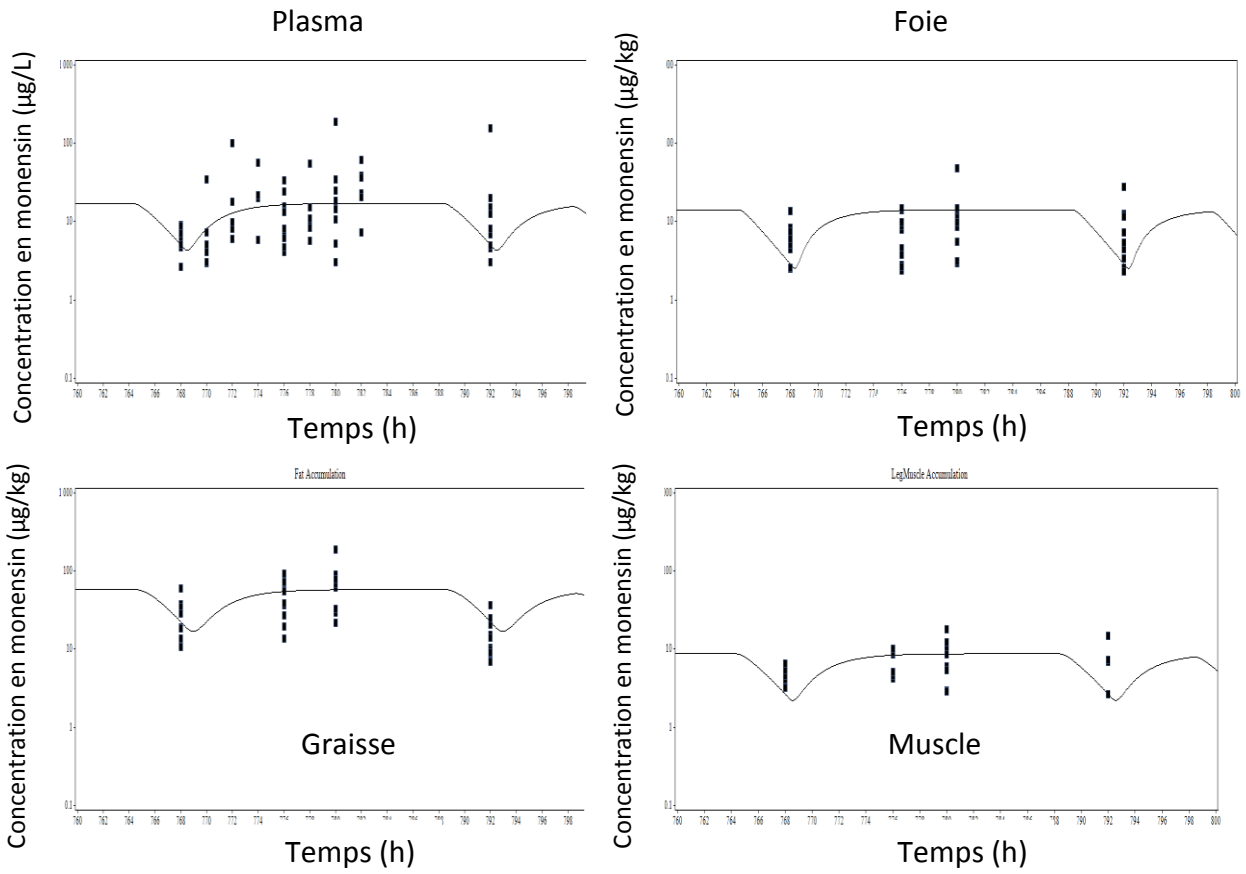


Figure 13 : Ajustement du modèle aux données (échelle logarithmique) plasmatiques (en haut à gauche), hépatiques (en haut à droite), adipeuses (en bas à gauche) et musculaires (en bas à droite) en fonction du temps à l'équilibre du traitement (le 32e jour) par l'aliment supplémenté; ligne continue : prédiction ; points : données observées

La Figure 13 représente les concentrations des compartiments *Plasma, Liver, Fat* et *LegMuscle* à l'état d'équilibre. On y observe les variations lors de la fin du 32ème jour (fin de la période de jour et les 4h de nuit), du 33ème jour entièrement (jour + nuit), ainsi que les 6h de reprise de consommation d'aliment supplémenté en monensin. L'optimisation de la biodisponibilité dans l'aliment a été réalisée en prenant en compte simultanément toutes les données disponibles (plasma, foie, graisse et muscle de la cuisse). Celle-ci est estimée à une valeur beaucoup plus faible que celle du monensin en solution, 3.88% au lieu de 29.91%. Globalement, le modèle permet de décrire correctement les concentrations à l'équilibre. Cependant, on peut noter une sous-estimation des concentrations juste avant la reprise de l'exposition au monensin (en fin de nuit).

2) Validation

a) Observations et prédictions vs temps

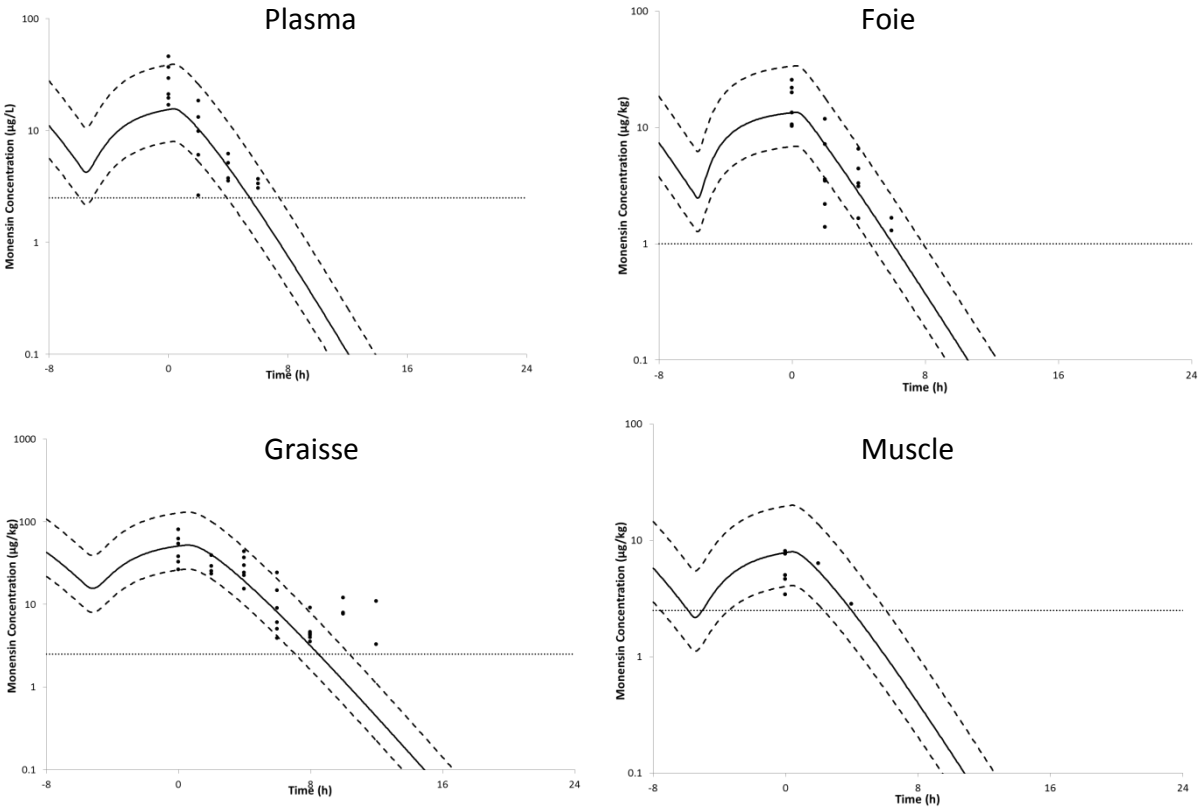


Figure 14 : Concentrations(échelle logarithmique) plasmatiques (en haut à gauche), hépatiques (en haut à droite), adipeuses (en bas à gauche) et musculaires (en bas à droite) observées et prédites en fonction du temps lors de la déplétion (Henri et al., 2009); ligne continue : prédictions moyennes ; points : données observées ; pointillés : limite de quantification ; tirets : limites basses et hautes des prédictions issues de la simulation de Monte-Carlo sur l'ingéré journalier (±3 écarts-type)

On peut observer sur la Figure 14, la fin de la période d'élimination (lumière éteinte) du 33ème jour et le 34ème jour dans son entier, avec 6 heures de consommation d'aliment supplémenté en monensin (rebond des concentrations pendant 6 heures) puis un passage à un aliment exempt de monensin, ce qui provoque la déplétion finale des concentrations.

Pour chaque compartiment, il y avait en principe 6 données observées par échéance mais pour le compartiment *Plasma*, *Liver* et *LegMuscle*, respectivement 6, 5 et 17 données ont été omises sur ce graphique entre les échéances 798h et 804h (bornes comprises) car elles étaient inférieures à la LOQ. Concernant le compartiment *Fat*, 9 données ont été omises

ente les échéances 798h et 810h (bornes comprises). Toutes les données après 810h ont été omises car elles aussi étaient inférieures à la LOQ.

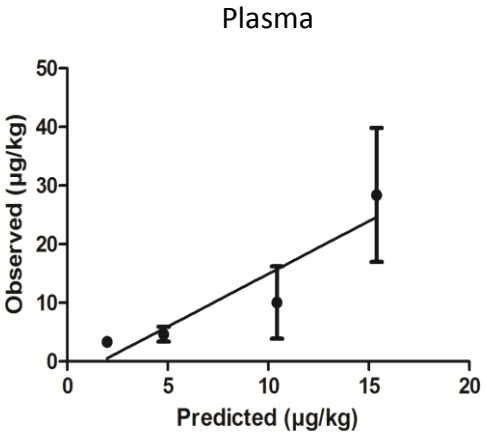
Concernant le plasma, le modèle tend à sous-estimer les concentrations à la première échéance, puis le reste des données observées sont correctement décrites. Même s'il porte à croire que le modèle sous-estime la dernière échéance, il faut rappeler que 3 points sur 6 sont sous la LOQ ; pour le foie, le modèle décrit très bien les données. Le compartiment de la graisse est lui aussi bien décrit. Ici encore, on pourrait croire que les dernières échéances sont sous-estimées à cause de l'omission des points en dessous de la LOQ. Concernant le muscle, la majorité des données observées ont été enlevées car en dessous de la LOQ. En conséquence, seule la première échéance peut être décrite par le modèle, qui la surestime légèrement. Mais la variabilité associée à la prise alimentaire permet de décrire 80% (Tableau 13) de la dispersion des données observées (et supérieures à la LOQ). Cela renforce l'idée que le comportement alimentaire du poulet est le facteur déterminant de l'exposition.

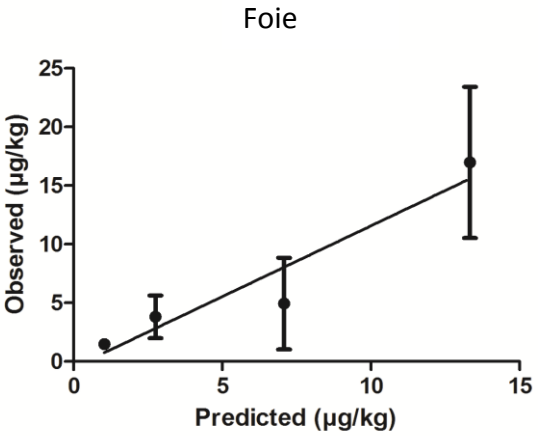
Tableau 13: Impact de la variabilité simulée de l'ingestion et de la biodisponibilité sur les données prédites

	Plasma	Foie	Graisse	Muscle	Toutes les matrices
Nombre de points totaux	18	19	33	7	77
Nombre de points hors bornes	2	4	8	1	15
% hors bornes	11%	21%	24%	14%	20%

b) Corrélation entre observations et prédictions

Une régression linéaire a été effectuée pour chaque compartiment selon l'équation : $Cobs = a \times Cpred + b$ avec *Cobs* la concentration observée, *Cpred* la concentration prédite, *a* la pente de la régression et *b* son ordonnée à l'origine. R^2 représente son coefficient de détermination (Figure 15, Tableau 14).





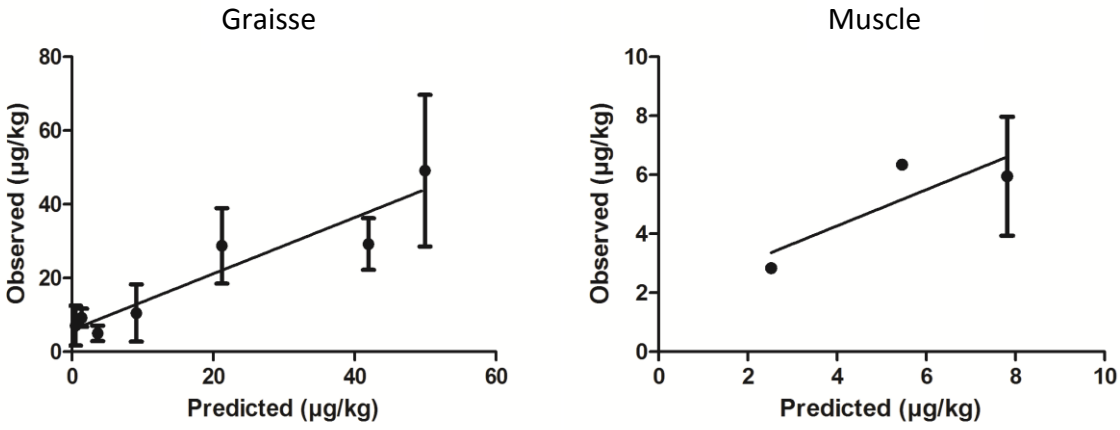


Figure 15 : Corrélation entre les concentrations plasmatiques (en haut à gauche), hépatiques (en haut à droite), adipeuses (en bas à gauche) et musculaires (en bas à droite) observées et prédites

Tableau 14 : Corrélation entre les concentrations observées et prédites

Compartiment	Pente (a)	Intercepte (b)	R^2
Plasma	1.799±0.509	-3.031±4.907	0.862
Foie	1.207±0.270	-0.498±2.076	0.901
Graisse	0.767±0.118	5.930±3.081	0.894
Muscle	0.614±0.388	1.816±2.208	0.710

Une corrélation satisfaisante a été établie entre les données observées et les données prédites, avec des coefficients de détermination de 86.2%, 90.1%, 89.4% et 71.0% au niveau plasmatique, hépatique, adipeux et musculaire respectivement (Tableau 14).

c) Résidus

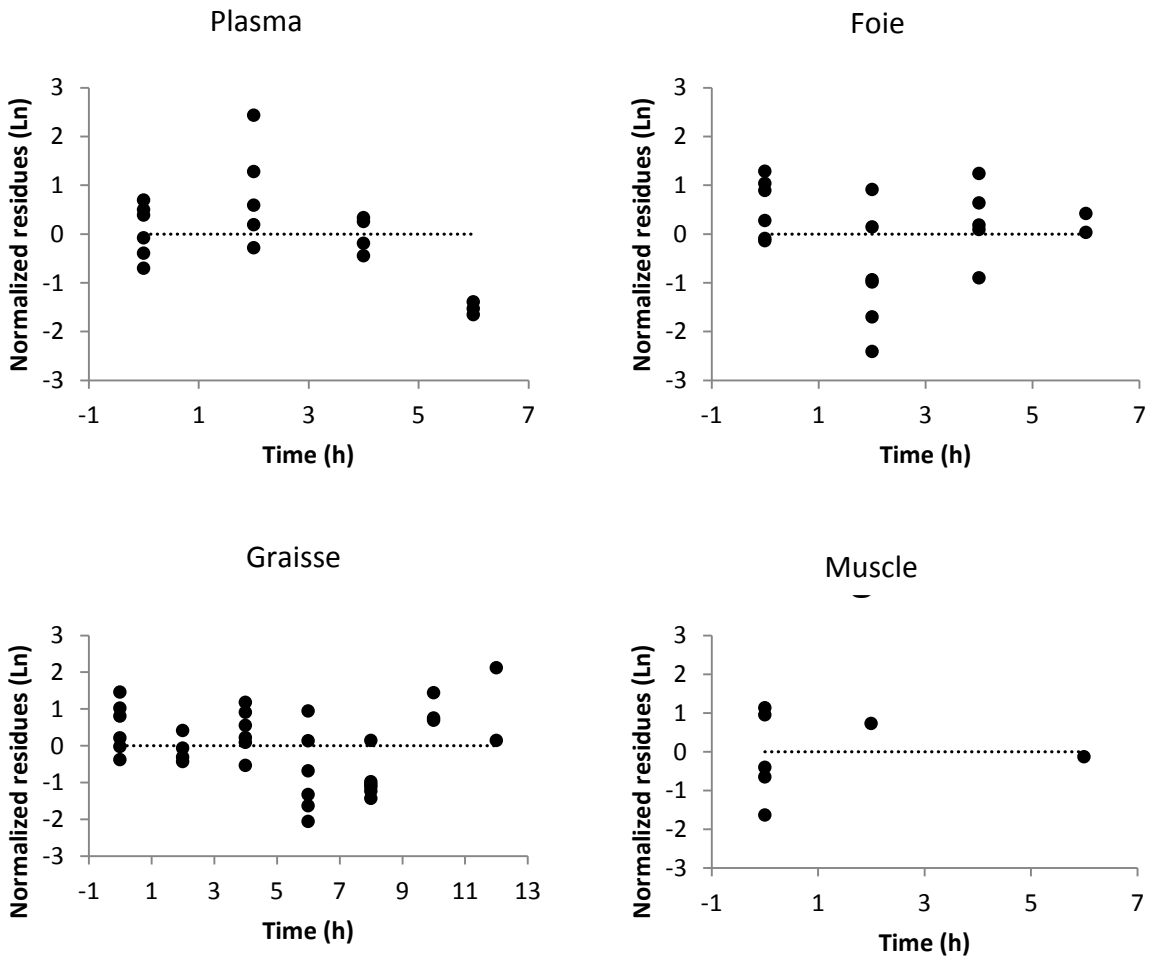


Figure 16 : Résidus standardisés (après transformation logarithmique) des concentrations plasmatiques (en haut à gauche), hépatiques (en haut à droite), adipeuses (en bas à gauche) et musculaires (en bas à droite) vis à vis des concentrations prédites

L'étude des résidus est une méthode d'évaluation de la différence entre des données observées et les données prédites correspondantes (Gabrielsson and Weiner, 2001).

Une étude des résidus normalisés en fonction du temps a été effectuée pour vérifier l'absence de tendance dans la structure du modèle. Les résidus standardisés après transformation logarithmique sont bien répartis autour de 0 (distribution aléatoire autour de 0), et 95% d'entre eux sont compris dans l'intervalle [-2 ; 2] (distribution des résidus selon une approximation de la loi normale centrée réduite). Cependant, l'analyse des résidus est

difficilement interprétable pour le muscle de la cuisse du fait de l'omission d'un grand nombre de points. Malgré l'allure satisfaisante des résidus, cette omission pourrait également faire croire qu'il existe des tendances à la sous ou à la surestimation des concentrations sur les échéances tardives dans le plasma, le foie et la graisse.

3) Analyse de sensibilité

Une analyse de sensibilité locale a été effectuée sur tous les paramètres du modèle : il en ressort 18 paramètres influents, ayant une valeur absolue minimale du CNS de 0.25 (*Éq 9*). Une valeur du CNS de 1 indique qu'il y a une relation 1-à-1 entre la variation du paramètre et celle de la concentration dans le tissu impliqué (par exemple, 10% de variation du paramètre entraine 10% de variation de la concentration). Un CNS négatif indique une relation inversement proportionnelle entre le paramètre et la concentration. Ces 18 paramètres ont été classés en fonction de la catégorie à laquelle ils appartiennent. Les paramètres considérés comme non influents (|CNS|<0.25), bien qu'également analysés ne seront pas cités ici.

a) Paramètres pharmacocinétiques

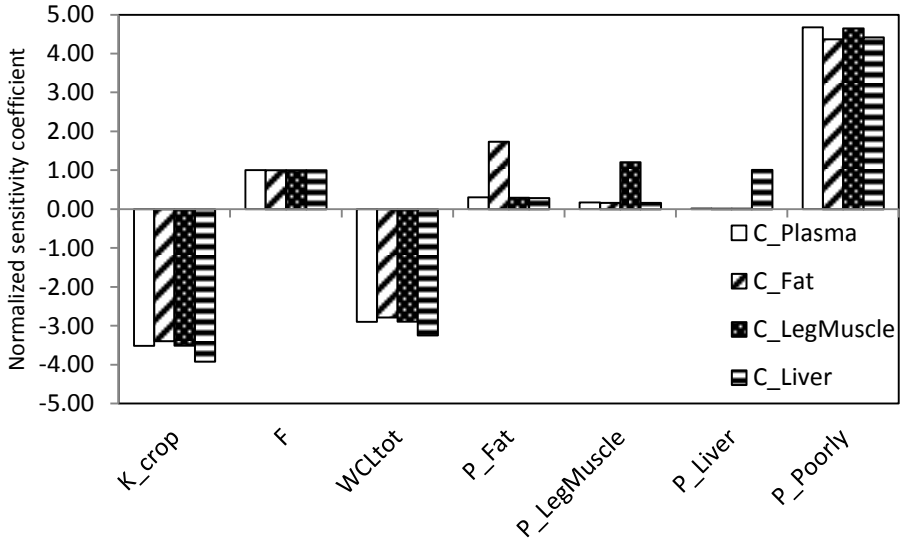


Figure 17 : Graphique de l'analyse de sensibilité locale des paramètres pharmacocinétiques

Les *paramètres K_crop, F, WCLtot, P_Fat, P_LegMuscle, P_Liver* et *P_Poorly* sont les paramètres pharmacocinétiques influents du modèle. Le *k_crop*, qui détermine l'absorption orale du monensin, possède un très fort CNS, tout comme la clairance totale *WCLtot* qui contrôle l'élimination du principe actif. Concernant, la distribution, le paramètre le plus influent est *P_Poorly*. Le compartiment « Poorly Perfused » agit comme un compartiment tampon, il permet d'équilibrer ce qu'il se passe dans les autres compartiments. Le moindre changement dans ce compartiment a un impact indirect sur tous les autres compartiments.

b) Paramètres physiologiques

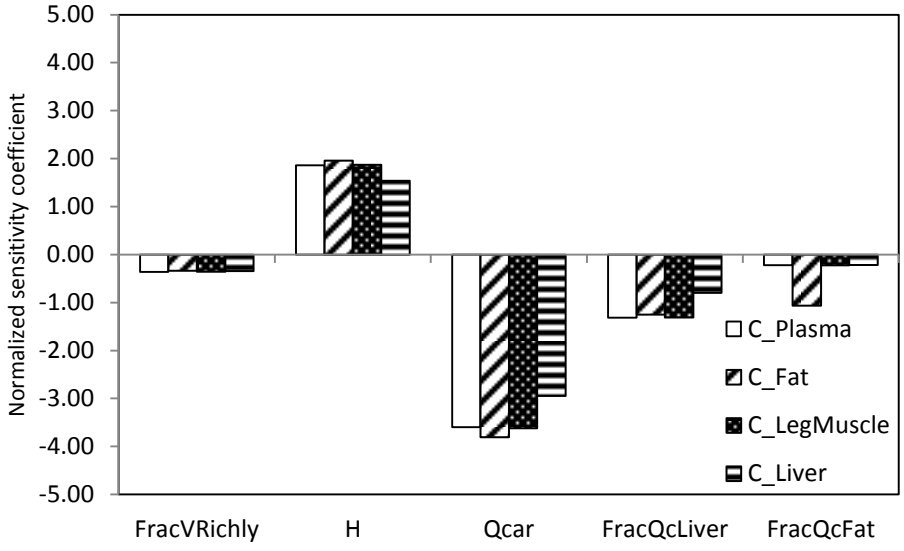


Figure 18 : Graphique de l'analyse de sensibilité locale des paramètres physiologiques

Les paramètres *FracVRichly, H, Qcar, FracQcLiver, FracQcFat* sont les paramètres physiologiques influents du modèle. Parmi ces paramètres, le plus influent est le *Qcar*, c'est-à-dire le débit cardiaque. En effet, ce débit gouverne la perfusion des compartiments, donc la distribution et l'élimination du monensin. L'hématocrite a quant à lui un effet positif sur les concentrations. S'il augmente, le volume de plasma diminue, aboutissant à une augmentation des concentrations.

c) Paramètres allométriques

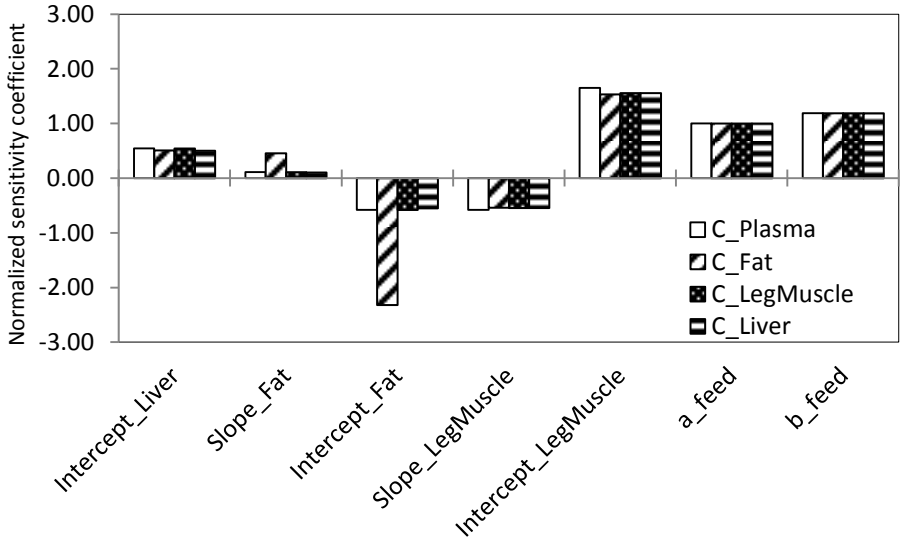


Figure 19 : Graphique de l'analyse de sensibilité locale des paramètres d'allométrie

Les paramètres Intercept_Liver, Slope_Fat, Intercept_Fat, Slope_LegMuscle, Intercept_LegMuscle, a_feed et b_feed sont les paramètres allométriques influents du modèle.

IV. Discussion

Un modèle PBPK perfusion-limitant a été développé et validé pour la prédiction des résidus de monensin chez le poulet. Ce modèle s'appuie très majoritairement sur des valeurs de paramètres fixés à partir de la littérature couplé à une optimisation réduite de seulement 4 paramètres (le *k_crop* qui est la constante de vitesse d'entrée dans l'intestin, les coefficients de partage *P_Richly* et *P_Poorl*y ainsi que la biodisponibilité *F* du monensin présent au sein des granulés d'alimentation). Il permet de décrire précisément les concentrations dans le plasma, le foie, la graisse abdominale ainsi que dans les muscles de la cuisse et ceci soit après administration d'une dose orale unique de monensin en solution, soit après exposition via une alimentation (*ad libitum*) supplémentée en monensin. La validité de ce modèle a été

prouvée par diagnostic graphique de (i) la confrontation des données observées et prédites avec la mise en place d'une variabilité sur l'ingestion par l'animal d'aliment supplémenté (ii) l'étude de la corrélation entre les concentrations prédites et observées pour chaque matrice et (iii) de l'étude de la résiduelle du modèle. Le diagramme du modèle a été simplifié au maximum, en accord avec le principe de parcimonie qui stipule qu'un modèle doit être le plus simple possible, afin de diminuer le nombre de paramètres dont les valeurs doivent être identifiées (Hayes and Kruger, 2014). De plus, une analyse locale de sensibilité a révélé l'influence prédominante de 18 d'entre eux.

Ce modèle nous a permis d'estimer la biodisponibilité du monensin incorporé dans l'aliment, qui est de 3,88%. Cette biodisponibilité du monensin dans l'aliment est en fait composée de 2 paramètres : la biodisponibilité propre au monensin, qui a été évaluée à 29.91% lors d'études *in vivo* chez le poulet (Henri et al., 2009), et la bioaccessibilité (fraction de la dose administrée qui est solubilisée dans le tractus gastro-intestinal et qui peut donc potentiellement franchir la barrière intestinale) du monensin incorporée au granulé (qui est donc de 3.88/29.91 ≈ 13%). Lors de l'étude qui vient d'être citée, le monensin était sous la forme d'une solution, donc entièrement accessible pour l'absorption. La biodisponibilité déterminée était donc la réelle biodisponibilité du monensin chez le poulet. Concernant le calcul de la biodisponibilité du monensin présent au sein de l'aliment destiné aux poulets, il existait deux possibilités : soit des cinétiques individuelles après administration d'une dose unique d'aliment étaient effectuées, soit elle était estimée à l'aide du modèle PBPK. C'est la seconde option qui a été choisie, car la maitrise expérimentale de la dose lors d'un gavage solide chez le poulet, est très difficile et entraîne une trop forte variabilité pour être exploitée (selon l'expérience du laboratoire).

Le *k_abs*, qui est pourtant un paramètre pharmacocinétique important, n'a pas été jugé influent par l'analyse locale de sensibilité. En effet, ce paramètre est victime d'un phénomène de flip-flop. Cela signifie que l'arrivée à l'intestin est limitante en comparaison au franchissement de la barrière intestinale (*k_crop*=0.63h^{-1} ; *k_abs*=3.85h^{-1}). L'ajout du paramètre *k_crop* et d'un compartiment avant l'intestin a été déterminant afin de bien

ajuster le modèle aux données plasmatiques lors de la phase croissante concernant l'administration unique par voie orale de monensin en solution. Ceci peut certainement être attribué à la présence d'un jabot chez la volaille (Anadón et al., 1993).

Une des limites de notre modèle est l'absence de variabilité inter-individuelle des coefficients de partage. En effet, les données sont issues de (Henri et al., 2009) où les coefficients de partage ont été calculés selon la méthode des aires (Gallo et al., 1987) et cette méthode ne permet pas la détermination de la variabilité inter-individuelle. Pour l'obtenir, il aurait fallu réaliser une étude avec une perfusion jusqu'à l'état d'équilibre sur des poulets, prélever leur plasma et leurs organes et déterminer leur teneur en monensin. Cependant, cette méthode est difficilement applicable aux poulets, puisqu'il faut les maintenir sous perfusion pendant plusieurs heures. La variabilité inter-individuelle a donc été fixée de manière empirique à 20% (Clewell and Clewell III, 2008).

Le foie est l'organe siège de l'élimination du monensin chez le poulet. 2 clairances lui sont assignées : une clairance métabolique, déterminée *in vitro* puis extrapolée *in vivo* (IVIVE) et une clairance biliaire (différence entre la clairance totale et la clairance métabolique). Les concentrations prédites dans le foie possèdent la meilleure corrélation aux concentrations observées (Figure 15 et Tableau 14**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces résultats positifs encouragent l'utilisation de l'IVIVE, dont les bénéfices du couplage aux modèles PBPK sont nombreux (Rostami-Hodjegan, 2012).

Il faut noter que les néphrons ne sont pas décrits dans le modèle. On aurait pu croire que leur omission est dû au fait que le monensin a une très faible excrétion urinaire (<1%, l'essentiel de l'excrétion étant hépatique, de nature métabolique et biliaire) (Davison, 1984) mais cela ne serait pas pertinent puisqu'ils présentent un intérêt réglementaire en terme de résidus. Ils se retrouvent donc par « lumping » (Nestorov et al., 1998), regroupés avec d'autres organes dans le compartiment « Richly Perfused ». La raison réelle pour laquelle ils ne sont pas décrits dans le modèle est que nous ne disposions pas de coefficient de partage

ni de données pour ce compartiment dans l'étude ayant servi à la validation (Henri et al., 2009) à cause de l'absence d'une méthode analytique validée. Un effort de développement analytique doit donc être réalisé afin de disposer d'une telle méthode.

Par ailleurs, le modèle montre une bonne corrélation entre les concentrations prédites et observées, quel que soit l'organe étudié (Figure 15) (tous ont une corrélation supérieure à 85%, Tableau 14), excepté pour les muscles de la cuisse, mais cela est dû à un manque de concentrations exploitables car elles sont très faibles dans cette matrice et deviennent rapidement inférieures à la LOQ. De même, le bréchet (muscle pectoral) n'a pas pu être décrit par manque de coefficient de partage et de données pour ce compartiment dans l'étude ayant servi à la validation (Henri et al., 2009) . En effet dans cette étude, les concentrations résiduelles de monensin dans le bréchet étaient la plupart du temps inférieures à la LOQ même à l'état d'équilibre. Là également, un effort de recherche en chimie analytique serait à faire pour rendre la méthode d'analyse dans le muscle plus sensible si l'on voulait décrire ce compartiment. D'un point de vue pharmacocinétique cette fois-ci, l'hypothèse du monensin (relativement lipophile) qui se distribuerait préférentiellement dans la cuisse (plus riche en graisse que le bréchet) a été vérifiée, comme annoncé pour d'autres molécules dans la littérature (Reyes-Herrera et al., 2005). Il a été par conséquent considéré que le bréchet représentait un risque de résidus moindre comparé à la cuisse, et que la cuisse était par conséquent plus importante à modéliser d'un point de vue résidus musculaires.

La graisse est un organe très exposé au monensin, du fait de sa lipophilie. En examinant les concentrations observées sur la Figure 14 l'élimination dans ce compartiment semble à première vue bi-phasique. Il pourrait s'agir d'un phénomène de séquestration avec relargage plus lent depuis la graisse, phénomène déjà observé notamment au niveau pulmonaire pour d'autres molécules (Levitt and Schnider, 2005). Mais en examinant mieux la figure et particulièrement la démarcation de la LOQ, les points manquants pourraient parfaitement se trouver en dessous de la LOQ dans l'intervalle autour de la pente monophasique. Les données en dessous de la LOQ n'ont pas pu être prise en compte car le

logiciel utilisé, contrairement aux logiciels de pharmacocinétique de population (modèles non linéaires à effet mixte), ne disposait pas d'algorithmes de maximum de vraisemblance adaptés aux données censurées (Bergstrand and Karlsson, 2009). On observe plus généralement dans la littérature le phénomène contraire où l'omission des données sous la LOQ peut faire manquer une élimination en 2 phases (Ahn et al., 2008; Jusko, 2012). L'information fournie par ces données sous la LOQ est donc importante, il serait donc intéressant de ne pas les ignorer et pour cela de réaliser des modèles PBPK avec des algorithmes d'ajustement permettant de distinguer dans le calcul de la vraisemblance la contribution des données au-dessus de la LOQ de celle des données en dessous de la LOQ.

Les différentes équations d'allométries (poids du poulet Equation 8; et croissance des organes Equation 9 et Tableau 10) ont été extraites par l'INRA de Nouzilly à partir des données des sélectionneurs. Avec ces équations, la simulation donne un poids de 1.4kg entre le 29ème et le 30ème jour ; lors de l'étude en dose unique, des poulets de cet âge ont été utilisés et pesaient 1.324kg. La différence est d'environ 6%, ce qui montre que l'équation est adaptée pour notre modèle. Concernant le foie et la graisse, les allométries donnent respectivement 2.44% du poids et 2.08% du poids au 30ème jour. Dans la littérature, le foie et la graisse représentent respectivement 2.4% et 5% du poids (Cortright et al., 2009). Le foie est donc très bien décrit, la graisse semble l'être un peu moins. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la mesure de la quantité totale de graisse est expérimentalement difficile et que la production de graisse s'effectue plus tard dans la croissance de l'animal. De plus, la proportion de graisse décrite dans la littérature (Cortright et al., 2009) représente un prélèvement effectué sur toute la carcasse, alors que nous avons décrit uniquement la graisse abdominale. Concernant les muscles de la cuisse, l'allométrie indique qu'ils représentent 14% du poids de l'animal. Dans la littérature, les muscles représentent jusqu'à 40% du poids de l'animal (Cortright et al., 2009). Si on ajoute les muscles du bréchet et les autres muscles du corps aux 14% de l'allométrie des muscles de la patte, il est fort probable qu'on atteigne les 40% retrouvés dans la littérature.

Le modèle développé ici pourra être amélioré avec des équations décrivant l'évolution (en fonction du temps ou en fonction du poids corporel) du débit cardiaque (*Qcar*) et/ou des débits de perfusion des organes (*FracQc_x*). Il existe des allométries sur le débit cardiaque dans la littérature (Wideman, 1999) mais nous n'avons pas intégré cela à notre modèle, puisque le domaine de validité de cette allométrie est réduit à la période 4-6 semaines et que nous n'avions pas de description complémentaire sur la perfusion des organes en fonction du temps. Il serait intéressant, en regroupant d'autres données de la littérature, de disposer d'une variabilité inter-individuelle sur ces débits de perfusion qui pourrait être intégrée aux simulations de Monte-Carlo au lieu d'appliquer une variabilité empirique.

Un poulet se nourrit régulièrement au cours de la journée (et uniquement dans les périodes éclairées), avec une multitude de petits repas, appelé picorage (entre 30 et 50 prises alimentaires par jour) (Goussopoulos et al., 1973). Le comportement alimentaire du poulet a donc été implémenté comme étant une administration orale continue (« perfusion orale ») de l'ingéré journalier durant les heures d'éclairage de l'élevage. De plus, le poulet anticipe la période de nuit en mangeant plus, ce qui peut expliquer pourquoi notre modèle a tendance à sous-estimer les concentrations en fin de nuit (Goussopoulos et al., 1973). Afin de tester l'impact du comportement alimentaire sur les concentrations, une étude de la variabilité de 2 paramètres de l'ingestion (*a_feed, b_feed)* et de la biodisponibilité (*F*) a été réalisée (Figure 14, Tableau 12 et Tableau 13). La seule variabilité de ces 3 paramètres permet d'expliquer 80% de la dispersion des données observées. L'ingestion est donc une phase primordiale du modèle, à la source d'une grande partie de la variabilité observée et pourrait faire l'objet d'un effort de modélisation plus intensif. En l'état actuel du modèle, cette variabilité ne permet néanmoins pas d'expliquer la totalité de la dispersion des données observées.

Afin de déterminer les paramètres les plus influents du modèle, une analyse locale de la sensibilité a été effectuée (Figure 17, Figure 18 et Figure 19), sur tous les paramètres qui composent le modèle, avec en sortie leur impact sur les concentrations plasmatiques, hépatiques, musculaires et adipeuses. Cette analyse locale a permis d'identifier dix-huit paramètres qui influencent le modèle : sept paramètres pharmacocinétiques, quatre

paramètres physiologiques et sept paramètres zootechniques. Mais l'analyse locale de sensibilité ne permet pas de décrire les interactions entre les paramètres. Pour cela, il faudrait effectuer une analyse globale de sensibilité (McNally et al., 2011).

Ce modèle PBPK a été validé pour simuler les concentrations de monensin chez le poulet de chair. Pour pouvoir calculer le temps d'attente, il va falloir procéder à une analyse de Monte-Carlo, qui est une technique probabiliste. Pour ce faire, il faut renseigner la variabilité de chaque paramètre du modèle. Le logiciel va générer, en fonction de sa loi de distribution, une valeur à chaque paramètre, qui sera incorporée au modèle lors de chaque simulation. En réalisant un grand nombre d'itérations, on pourra générer les différents profils que l'on retrouverait dans la population.

L'utilisation des modèles PBPK a un avantage majeur par rapport à la méthode actuelle de calcul des temps d'attente (régression linéaire) : cette dernière fait l'hypothèse qu'il y ait suffisamment de points lors de la phase de déplétion. De plus, la pente terminale doit être linéaire. Ainsi, cette méthode est de nature descriptive et dépendante des jeux de données tandis que les modèles PBPK se basent sur des équations de transfert de masse et ne dépendent pas des jeux de données pour la détermination du temps d'attente qui de ce fait, calculé par rapport à la population, peut être plus précis (Yang et al., 2013).

V. Conclusion

Ce modèle PBPK a été validé pour simuler les concentrations de monensin chez le poulet de chair. Pour pouvoir calculer le temps d'attente, il va falloir procéder à des simulations de Monte-Carlo. Pour ce faire, il faut renseigner la variabilité de chaque paramètre du modèle. Ensuite, le logiciel va générer, en fonction de sa loi de distribution, une valeur à chaque paramètre. En réalisant un grand nombre d'itérations, on pourra générer les différents profils que l'on retrouverait dans la population.

La méthode réglementaire pour le calcul des temps d'attente se base sur la déplétion linéaire, qui se fait sur des concentrations log-transformées et qui induit donc un biais de calcul. La PBPK en se basant sur des équations de transfert de principe actif, permet de travailler avec les données brutes, ce qui est un avantage pour le calcul du temps d'attente et au final de la protection du consommateur.

Ce modèle PBPK, de par la façon dont il a été implémenté, pourra être utilisé en cas de changement de type de poulet (modification des performances zootechniques) et/ou de programme lumineux (durée d'exposition) et/ou de niveau de supplémentation de l'aliment en monensin (niveau d'exposition), l'ensemble permettant de décrire l'exposition.

Ce modèle, validé chez le poulet de chair, pourra également être extrapolé à d'autres espèces aviaires. En remplaçant les paramètres zootechniques, physiologiques et biochimiques du poulet par ceux du dindon par exemple (Henri et al., 2012), il sera possible de prédire les concentrations résiduelles chez le dindon d'élevage, lui aussi victime de coccidioses et par conséquent traité avec du monensin. De plus, il serait intéressant de rajouter un compartiment d'intérêt important pour la sécurité alimentaire : l'œuf. Ce modèle du poulet de chair serait désormais appliqué à la poule pondeuse, afin d'évaluer la contamination des œufs, comme c'est le cas pour d'autres contaminants (MacLachlan, 2010). Notre modèle serait particulièrement adapté pour la poule pondeuse puisqu'il comprend des équations de croissance, donc est évolutif dans le temps, tout comme l'est la formation de l'œuf qui est d'environ 20 jours.

Annexe

Code utilisé dans acslX®

```
PROGRAM


        INITIAL

!!Physiological Parameters!!

!Volumes!
constant FracVBLOOD=0.06 !%, (Yang, 2014) blood fraction of BW
constant HAEMATOCRIT=0.33 !%, (Yang, 2014)
constant FracVRICHLY=0.088 !%, Calculated from (Cortright, 2009) Sum of richly perfused tissues fraction of BW
!Flows!
constant Qcar=12.5 !L/h/kg bw, (Wideman, 1999) cardiac output
constant FracQcLiver=0.25 !%, (Cortright, 2009) liver fraction of CO
constant FracQcFat=0.015 !%, (Cortright, 2009) fat fraction of CO
constant FracQcLegMuscle=0.1155 !%, leg muscle fraction of CO from Cortright, 2009 (muscles flow/3)

!!Pharmacokinetic Parameters!!

!Absorption constants!
constant K_abs=3.85 !h-1, (Henri, 2009) constant of absorption
constant F=0.0388 !%, Optimized bioavailability
constant K_crop=0.63 !h-1, Optimized constant of absorption of crop to gut
!!Absorption lag time!!
integer nmx
parameter (nmx = 100) !no unit, a literal integer giving the maximum number of saved data points needed to represent the lag time
constant ic = 0.0 !no unit, initial value of the output until the independent variable has advanced by the lag time
constant lagtime =0.25 !h, delay time between input and output (Henri, 2009)
constant delmin = 0.05 !no unit, literal integer giving the maximum number of saved data points needed to represent the delay

!Partition coefficients (Distribution)!
constant P_LIVER=0.83 !no unit, (Henri, 2009) liver/plasma partition coefficient
constant P_FAT=3.39 !no unit, (Henri, 2009) fat/plasma partition coefficient
constant P_LEGMUSCLE=0.51 !no unit, (Henri, 2009) leg muscle/plasma partition coefficient
constant P_RICHLY=1.28 !no unit, optimized richly perfused/plasma partition coefficient
constant P_POORLY=1.43 !no unit, optimized poorly perfused/plasma partition coefficient

!Elimination!
```

```
constant WCLTOT=2.17 !!L/h/kg bw, (Henri, 2009) total clearance in function of BW
!Hepatic metabolism!
constant Vmax=646 !pmol/mg/min, (Henri, 2008) maximal metabolization rate on microsomes
constant Km=28.6 !microM, (Henri, 2008) Michealis constant
constant Fu=0.772 !%, (Atef, 1992) unbound fraction
constant MPPGL=9.31 !mg of microsomal proteins per gram of liver, (in house data)


END ! INITIAL

DYNAMIC

ALGORITHM IALG = 5
                NSTEPS    NSTP = 10
                MAXTERVAL MAXT = 1.0e9
                MINTERVAL MINT = 1.0e-9
                CINTERVAL CINT = 0.05


DERIVATIVE

!!Physiology in function of age!!

!growth equations from breeders data, can be changed in function of the desired chickens!
!Bodyweight (BW) growth during lifespan!
constant AgeBegin=1 !days, age at the beginning of the growth curve
constant AgeEnd=35 !days, age at the end of the growth curve
constant BWBegin=0.04!kg, BW at the beginning of the growth curve
constant BWEnd=2.04!kg, BW at the end of the growth curve
constant Bgompertz=0.0445516! growth rate of the gompertz function
constant hoursinaday=24 ! conversion from days to hours
Bodyweight=BWEnd*(BWEnd/BWBegin)**(-(exp(-Bgompertz*(AgeEnd-AgeBegin))-exp(-Bgompertz*(  (T/hoursinaday)  -AgeBegin)))/(  -1+exp(-Bgompertz*(  AgeEnd-AgeBegin))))! Gompertz function, BW growth in function of time
!Liver growth!
constant slope_liver=0.8683 ! slope of the growth curve
constant intercept_liver=-3.673 ! intercept of the growth curve
V_LIVER=exp(slope_liver*log(BODYWEIGHT)+intercept_liver)! Liver growth in function of BW
!Fat growth!
constant slope_fat=1.188 ! slope of the growth curve
constant intercept_fat=-3.9275 ! intercept of the growth curve
V_FAT=exp(slope_fat*log(BODYWEIGHT)+intercept_fat)!  Fat  growth  in  function  of  bodyweight
!Leg muscle growth!
constant slope_LegMuscle=1.071 ! slope of the growth curve
constant intercept_LegMuscle=-1.965174944 ! intercept of the growth curve
```

```
V_LEGMUSCLE=exp(slope_legmuscle*log(BODYWEIGHT)+intercept_legmuscle)! Leg muscle growth in function of bodyweight
!end of growth equations from breeders data!

!Scaled volumes, constant fractions of BW!
!Plasma volume!
V_PLASMA=(FracVBLOOD*BODYWEIGHT)*(1-HAEMATOCRIT) !blood volume scaled on BW
!Richly perfused tissues volume!
V_RICHLY=(FracVRICHLY*BODYWEIGHT) !richly perfused compartment volume scaled on BW
!Poorly perfused tissues volume!
V_POORLY=BODYWEIGHT-(V_LIVER+V_PLASMA+V_FAT+V_LEGMUSCLE+V_RICHLY)    !poorly perfused compartment volume as the remaining volume
!Check if the sum of volumes = BodyWeight (+/-5%)
VCHECK=(V_LIVER+V_PLASMA+V_FAT+V_LEGMUSCLE+V_RICHLY+V_POORLY)/BODYWEIGHT
constant Volume_min=0.95 !%
constant Volume_max=1.05 !%
termt(VCHECK.lt.Volume_min,'sum of volumes is less than BODYWEIGHT')
termt(VCHECK.gt.Volume_max,'sum of volumes is larger than BODYWEIGHT')

!Scaled flows, constant fractions of QTOT!
QTOT=(Qcar*BODYWEIGHT)*(1-HAEMATOCRIT) !Cardiac Output of plasma scaled on BW and H
QcLIVER=FracQcLiver*QTOT !blood flow to liver scaled on Qtot
QcFAT=FracQcFat*QTOT !blood flow to fat scaled on Qtot
QcLEGMUSCLE=FracQcLegMuscle*QTOT !blood flow to leg muscle scaled on Qtot
FracQcREST=1-(FracQcLIVER+FracQcFAT+FracQcLegMuscle) !fraction of blood flow to the rest of the body
QcREST=FracQcREST*QTOT !blood flow to the rest of the body scaled on Qtot
!Rest of the body divided into richly and poorly perfused tissues
QcRICHLY=0.75*QcREST !75% of the remaining blood flow is attributed to the remaining richly perfused tissues (Haddad, 1998)
QcPOORLY=0.25*QcREST !25% of the remaining blood flow is attributed to the remaining poorly perfused tissues (Haddad, 1998)
!check if the sum of blood flows = Qtot (+- 5%)
QCHECK=(QcLIVER+QcFAT+QcLEGMUSCLE+QcREST)/QTOT
constant Qmin=0.95 !%
constant Qmax=1.05 !%
termt(QCHECK.lt.Qmin,'sum of blood flows is less than QTOT')
termt(QCHECK.gt.Qmax,'sum of blood flows is larger than QTOT')

!!Clearances scaling!!

!Total clearance (divided into a metabolic clearance and a remaining non metabolic clearance)
CLTOT=WCLTOT*BODYWEIGHT !L/h, total clearance scaled on BW
!Metabolic clearance calculation (IVIVE)
```

```
CLintvitro=60*(Vmax/(Km*1E6)) !intrinsic clearance on microsomes, conversion min to h and microM to pmol (L/h/g of microsomes)
CLintliver=CLintvitro*MPPGL*1000*V_LIVER !intrinsic clearance of the liver, conversion g of liver to kg of liver (L/h)
CLmet=(QcLIVER*Fu*CLintliver)/(QcLIVER+(Fu*CLintliver)) !L/h Metabolic clearance calculated by IVIVE (well stirred model)
!Non metabolic clearance (as a biliary clearance)
CLbil=CLTOT-CLmet !L/h ,Biliary clearance

!!Exposure!!

!Feed intake  from breeders data, can be changed in function of the desired chickens!
constant a_feed=266.2
constant b_feed=0.0005815
feed_intake=(a_feed*(1-exp(-b_feed*BODYWEIGHT))) !feed intake equation in function of BW

!Monensin ingestion rate depending on feed intake, feed supplementation level
!the daily dose is distributed over the lighting period
!it is assumed that chickens only eat when light is switched on
constant LightingPeriod=20    ! h lighting period in a day (Henri, 2009)
constant feed_suppl_level=125000 !microg of monensin per kg of feed, Monensin supplementation level(Henri, 2009)
ingestion_rate=(feed_intake*feed_suppl_level)/LightingPeriod !microg of monensin per hour

!Events and Periods
constant PulseInterval=24.0        ! h, Interval between two pulses of ingestion
TreatmentPeriod=6+33*hoursinaday !33 days of exposure plus 6 hours the day after (supperposition principle)
constant TreatmentStart = 0.0            ! h, beginning of the treatment (start time of the first pulse)
SimulationPeriod=34*hoursinaday                        ! h, lifespan

!!Compartments!!

                !Liver compartment!
                constant A_LIVER_0=0 !amount in the liver at t=0
                C_LIVER=A_LIVER/V_LIVER !concentration in the liver
                Ctb_LIVER=C_LIVER/P_LIVER !concentration in tissue plasma
                R_METAB=CLmet*Ctb_LIVER !rate of metabolization
                R_BIL=CLbil*Ctb_LIVER !rate of excretion via the bile
                R_LIVER=QcLIVER*(C_PLASMA-Ctb_LIVER)-R_METAB-R_BIL+K_abs*A_GUT
!rate of change of amount in the liver
                A_LIVER=integ(R_LIVER,A_LIVER_0)  !ACSL coding for integration of mass balance to calculate amount in the compartment
```

```
!Plasma compartment!
constant A_PLASMA_0=0 !amount in the plasma at t=0
C_PLASMA=A_PLASMA/V_PLASMA !concentration in the plasma

R_PLASMA=(QcLIVER*Ctb_LIVER)+(QcFAT*Ctb_FAT)+(QcLEGMUSCLE*Ctb_LEGMUSCLE)+(QcRICHLY*Ctb_RICHLY)+(QcPOORLY*Ctb_POORLY)-(QTOT*C_PLASMA)!-R_BOLUS !!rate of change of amount in the plasma
A_PLASMA=integ(R_PLASMA,A_PLASMA_0) !ACSL coding for integration of mass balance to calculate amount in the compartment

!Fat compartment!
constant A_FAT_0=0 !amount in the fat at t=0
C_FAT=A_FAT/V_FAT !concentration in the fat
Ctb_FAT=C_FAT/P_FAT !concentration in tissue plasma
R_FAT=QcFAT*(C_PLASMA-Ctb_FAT) !rate of change of amount in the fat
A_FAT=integ(R_FAT,A_FAT_0) !ACSL coding for integration of mass balance to calculate amount in the compartment

!Leg Muscle compartment!
constant A_LEGMUSCLE_0=0 !amount in the leg muscle at t=0
C_LEGMUSCLE=A_LEGMUSCLE/V_LEGMUSCLE !concentration in the leg muscle
Ctb_LEGMUSCLE=C_LEGMUSCLE/P_LEGMUSCLE !concentration in tissue plasma
R_LEGMUSCLE=QcLEGMUSCLE*(C_PLASMA-Ctb_LEGMUSCLE) !rate of change of amount in the leg muscle
A_LEGMUSCLE=integ(R_LEGMUSCLE,A_LEGMUSCLE_0) !ACSL coding for integration of mass balance to calculate amount in the compartment

!Rest Richly perfused!
constant A_RICHLY_0=0 !amount in the richly perfused compartment at t=0
C_RICHLY=A_RICHLY/V_RICHLY !concentration in the richly perfused compartment
Ctb_RICHLY=C_RICHLY/P_RICHLY !concentration in plasma tissue
R_RICHLY=QcRICHLY*(C_PLASMA-Ctb_RICHLY) !rate of change of amount in the richly perfused compartment
A_RICHLY=integ(R_RICHLY,A_RICHLY_0) !ACSL coding for integration of mass balance to calculate amount in the compartment

!Rest Poorly perfused!
constant A_POORLY_0=0 !amount in the poorly perfused compartment at t=0
C_POORLY=A_POORLY/V_POORLY !concentration in the poorly perfused compartment
Ctb_POORLY=C_POORLY/P_POORLY !concentration in plasma tissue
R_POORLY=QcPOORLY*(C_PLASMA-Ctb_POORLY) !rate of change of amount in the poorly perfused compartment
```

```
                A_POORLY=integ(R_POORLY,A_POORLY_0)  !ACSL coding for integration of
mass balance to calculate amount in the compartment

                !compartment for crop!
if(t.le.TreatmentPeriod) then
   R_CROP        =        f*ingestion_rate*pulse(TreatmentStart,PulseInterval,LightingPeriod)-
K_crop*A_CROP !rate of change of amount of monensin with a pulsing infusion
                !Pulse starts at the beginning of the treatment(TreatmentStart) and is
repeated every day (PulseInterval) when light is switched on (LightingPeriod)
else
   R_CROP = 0.0-K_crop*A_CROP
end if

                A_CROP=integ(R_CROP,0)  !ACSL coding for integration of mass balance to
calculate amount in the compartment

                !compartment for gut!
                constant A_GUT_0=0 !amount in the gut at t=0
                R_GUT=delay(K_crop*A_CROP, ic, lagtime, nmx, delmin)-(K_abs*A_GUT)!rate
of change of amount in the gut
                A_GUT=integ(R_GUT,A_GUT_0)  !ACSL coding for integration of mass balance
to calculate amount in the compartment

                !Mass balance CHECK!

        A_CHECK=A_POORLY+A_RICHLY+A_LEGMUSCLE+A_FAT+A_PLASMA+A_LIVER+A_GUT
+A_CROP+integ(R_METAB,0)+integ(R_BIL,0)


END ! DERIVATIVE
                ! Add discrete events here as needed
                 !DISCRETE
                 !END
                ! code that is executed once at each communication interval goes here
                 TSTOP = SimulationPeriod
                TERMT (T .GE. TSTOP, 'checked on communication interval: REACHED TSTOP')
        END ! DYNAMIC

        TERMINAL
                ! code that is executed once at the end of a simulation run goes here
        END ! TERMINAL

END ! PROGRAM
```

Bibliographie

- Ahn, J. E., Karlsson, M. O., Dunne, A., and Ludden, T. M.: Likelihood based approaches to handling data below the quantification limit using NONMEM VI. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics **35** (4)**:** 401-421, 2008.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M., and Fernández-Cruz, M.: Considérations physiologiques et pharmacologiques en thérapeutique aviaire. Revue Méd Vét **144:** 745-757, 1993.
- Andersen, M. E.: Development of physiologically based pharmacokinetic and physiologically based pharmacodymamic models for applications in toxicology and risk assessment. Toxicology Letters **79** (1–3)**:** 35-44, 1995.
- ANSES: Avis sur l"Evaluation des risques d'émergence d'antibiorésistances liées aux modes d'utilisation des antibiotiques dans le domaine de la santé animale". 2014.
- Atef, M., Ramadan, A., and abo el-Sooud, K.: Pharmacokinetic profile and tissue distribution of monensin in broiler chickens. British poultry science **34** (1)**:** 195-203, 1993.
- Barter, Z. E., Bayliss, M. K., Beaune, P. H., Boobis, A. R., Carlile, D. J., Edwards, R. J., Brian Houston, J., Lake, B. G., Lipscomb, J. C., and Pelkonen, O. R.: Scaling factors for the extrapolation of in vivo metabolic drug clearance from in vitro data: reaching a consensus on values of human micro-somal protein and hepatocellularity per gram of liver. Current drug metabolism **8** (1)**:** 33-45, 2007.
-Barton, H. A., Chiu, W. A., Setzer, R. W., Andersen, M. E., Bailer, A. J., Bois, F. Y., DeWoskin, R. S., Hays, S., Johanson, G., and Jones, N.: Characterizing uncertainty and variability in physiologically based pharmacokinetic models: state of the science and needs for research and implementation. Toxicological Sciences **99** (2)**:** 395-402, 2007.
- Bergstrand, M., and Karlsson, M. O.: Handling data below the limit of quantification in mixed effect models. The AAPS journal **11** (2)**:** 371-380, 2009.
- Boissieu, C., and Guérin, J.-L.: Les coccidioses aviaires. 2008.
- Bostvironnois C., Z. C.: Coccidioses subcliniques en production de poulet de chair, bilans et prospectives. 2011.
- Butaye, P., Devriese, L. A., and Haesebrouck, F.: Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. Clinical microbiology reviews **16** (2)**:** 175-188, 2003.
- Chapel, A., and Sanders, P.: Réalisation d'un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie en médecine vétérinaire: Revue bibliographique. Revue de médecine vétérinaire **147** (5)**:** 359-366, 1996.
- Chapman, H., and Hacker, A.: Sensitivity of field isolates of Eimeria from two broiler complexes to anticoccidial drugs in the chicken. Poultry science **73** (9)**:** 1404-1408, 1994.
- Chapman, H. D., Jeffers, T. K., and Williams, R. B.: Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. Poultry Science **89** (9)**:** 1788-1801, 2010.
- Chéneau, E., Henri, J., Pirotais, Y., Abjean, J.-P., Roudaut, B., Sanders, P., and Laurentie, M.: Liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: Applying a total error approach. Journal of Chromatography B **850** (1)**:** 15-23, 2007.
- Clewell 3rd, H., Gentry, P. R., Covington, T. R., and Gearhart, J. M.: Development of a physiologically based pharmacokinetic model of trichloroethylene and its metabolites for use in risk assessment. Environmental health perspectives **108** (Suppl 2)**:** 283, 2000.
Clewell, R. A., and Clewell III, H. J.: Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. Regulatory Toxicology and Pharmacology **50** (1)**:** 129-143, 2008.
-Concordet, D., and Toutain, P.: The withdrawal time estimation of veterinary drugs revisited. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **20** (5)**:** 380-386, 1997.
- Cortright, K., Wetzlich, S., and Craigmill, A.: A PBPK model for midazolam in four avian species. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics **32** (6)**:** 552-565, 2009.
- CVMP, E.: Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods, EMEA/CVMP/036/95–Final, 1996.

- Dakpogan, H. B., Salifou, S., Mensah, G. A., Gbangbotche, A., Youssao, I., Naciri, M., and Sakiti, N.: Problématique du contrôle et de la prévention de la coccidiose du poulet. International Journal of Biological and Chemical Sciences **6** (6)**:** 6088-6105, 2013.
- Davison, K. L.: Monensin absorption and metabolism in calves and chickens. Journal of Agricultural and Food Chemistry **32** (6)**:** 1273-1277, 1984.
- De Gussem, M.: Coccidiosis in poultry: review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. *In* Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition, pp. 253-261.
- Donoho, A., Manthey, J., Occolowitz, J., and Zornes, L.: Metabolism of monensin in the steer and rat. Journal of agricultural and food chemistry **26** (5)**:** 1090-1095, 1978.
- Donoho, A. L., Herberg, R. J., Zornes, L. L., and Van Duyn, R. L.: Excretion and tissue distribution of [14C] monensin in chickens. Journal of agricultural and food chemistry **30** (5)**:** 909-913, 1982.
- EFSA: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request of the Commission on the reevaluation of coccidiostat Elancoban in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. 2004.
- EFSA: Scientific Opinion on the safety and efficacy of Coxidin (monensin sodium) as feed additive for chickens reared for laying. 2011.
- EMA: Concept paper on the revision of the Note for guidance on the approach towards harmonisation of withdrawal periods. 2013.
- EPA: Uncertainty and variability in PBPK models : key issues and case study. 2008.
- EU, J.: Règlement (CE) No 1831/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux, 2003.
- Fahim, M., and Pressman, B. C.: Cardiovascular effects and pharmacokinetics of the carboxylic ionophore monensin in dogs and rabbits. Life sciences **29** (19)**:** 1959-1966, 1981.
- Gabrielsson, J., and Weiner, D.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications, CRC Press, 2001.
- Gallo, J. M., Lam, F. C., and Perrier, D. G.: Area method for the estimation of partition coefficients for physiological pharmacokinetic models. Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics **15** (3)**:** 271-280, 1987.
- Gould, S. J.: Allometry and size in ontogeny and phylogeny. Biol. Rev **41** (4)**:** 587-640, 1966.
- Goussopoulos, J., Carles, Y., Prud'hon, M., and Bacou, F.: Enregistrement graphique de l'activité et du comportement alimentaire du poulet. *In* Annales de zootechnie, pp. 133-145.
- Haberkorn, A., and Stoltefuss, J.: Studies on the activity spectrum of toltrazuril, a new anti-coccidial agent. VMR, Veterinary medical review, 1987.
- Haddad, S., Withey, J., Laparé, S., Law, F., and Krishnan, K.: Physiologically-based pharmacokinetic modeling of pyrene in the rat. Environmental toxicology and pharmacology **5** (4)**:** 245-255, 1998.
- Harder, A., and Haberkorn, A.: Possible mode of action of toltrazuril: studies on twoEimeria species and mammalian andAscaris suum enzymes. Parasitology research **76** (1)**:** 8-12, 1989.
- Hayes, A. W., and Kruger, C. L.: Hayes' principles and methods of toxicology, CRC Press, 2014.
- Haynes, D. H., Wiens, T., and Pressman, B. C.: Turnover numbers for ionophore-catalyzed cation transport across the mitochondrial membrane. The Journal of Membrane Biology **18** (1)**:** 23-38, 1974.
- Hellriegel, E. T., Bjornsson, T. D., and Hauck, W. W.: Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: Implications for bioavailability and bioequivalence studies. Clinical Pharmacology and Therapeutics **60** (6)**:** 601-607, 1996.
- Henri, J.: Etude comparative de deux ionophores carboxyliques chez la volaille: apport de la modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie, Poitiers, 2008.
- Henri, J., Burel, C., Sanders, P., and Laurentie, M.: Bioavailability, distribution and depletion of monensin in chickens. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **32** (5)**:** 451-456, 2009.
- Henri, J., Manceau, J., Sanders, P., and Laurentie, M.: Cytochrome P450-dependent metabolism of monensin in hepatic microsomes from chickens and turkeys. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **31** (6)**:** 584-586, 2008.

- Henri, J., Maurice, R., Postollec, G., DUBREIL-CHENEAU, E., Roudaut, B., Laurentie, M., and Sanders, P.: Comparison of the oral bioavailability and tissue disposition of monensin and salinomycin in chickens and turkeys. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics **35** (1)**:** 73-81, 2012.
- Herberg, R., and Van Duyn, R.: Excretion and tissue distribution studies in chickens fed 3H-labeled monensin (Na salt). Journal of agricultural and food chemistry **17** (4)**:** 853-856, 1969.
- Houston, J. B., Rowland-Yeo, K., and Zanelli, U.: Evaluation of the novel in vitro systems for hepatic drug clearance and assessment of their predictive utility. Toxicology in Vitro **26** (8)**:** 1265-1271, 2012.
- Jusko, W. J.: Use of pharmacokinetic data below lower limit of quantitation values. Pharmaceutical research **29** (9)**:** 2628-2631, 2012.
- Labaune, J.-P., and Wepierre, J.: Pharmacocinétique: principes fondamentaux. 1984.
- Levitt, D. G., and Schnider, T. W.: Human physiologically based pharmacokinetic model for propofol. BMC anesthesiology **5** (1)**:** 4, 2005.
- Lloyd-Evans, L.: Markets for anticoccidials. Animal Pharm, Trends in Veterinary Research and Development **35**, 1991.
- Loizou, G., Spendiff, M., Barton, H. A., Bessems, J., Bois, F. Y., d'Yvoire, M. B., Buist, H., Clewell, H. J., Meek, B., and Gundert-Remy, U.: Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: the first steps. Regulatory toxicology and pharmacology **50** (3)**:** 400-411, 2008.
- Lopes, N. P., Stark, C. B., Hong, H., Gates, P. J., and Staunton, J.: A study of the effect of pH, solvent system, cone potential and the addition of crown ethers on the formation of the monensin protonated parent ion in electrospray mass spectrometry. Analyst **126** (10)**:** 1630-1632, 2001.
- MacLachlan, D.: Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for residues of lipophilic pesticides in poultry. Food Additives and Contaminants **27** (3)**:** 302-314, 2010.
- Martin-Jimenez, T., Papich, M., and Riviere, J.: Population pharmacokinetics of gentamicin in horses. American journal of veterinary research **59** (12)**:** 1589-1598, 1998.
- McNally, K., Cotton, R., and Loizou, G. D.: A workflow for global sensitivity analysis of PBPK models. Frontiers in pharmacology **2**, 2011.
- Mendez, J., and Keys, A.: Density and composition of mammalian muscle. Metabolism-Clinical and Experimental **9** (2)**:** 184-188, 1960.
- Mordenti, J.: Man versus beast: pharmacokinetic scaling in mammals. Journal of pharmaceutical sciences **75** (11)**:** 1028-1040, 1986.
- Nebbia, C., Ceppa, L., Dacasto, M., Carletti, M., and Nachtmann, C.: Oxidative metabolism of monensin in rat liver microsomes and interactions with tiamulin and other chemotherapeutic agents: evidence for the involvement of cytochrome P-450 3A subfamily. Drug metabolism and disposition **27** (9)**:** 1039-1044, 1999.
- Nestorov, I.: Modelling and simulation of variability and uncertainty in toxicokinetics and pharmacokinetics. Toxicology letters **120** (1)**:** 411-420, 2001.
- Nestorov, I. A., Aarons, L. J., Arundel, P. A., and Rowland, M.: Lumping of whole-body physiologically based pharmacokinetic models. Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics **26** (1)**:** 21-46, 1998.
- OMS: Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l" évaluation relatives à la médecine traditionnelle, Genève, 2000.
- Pelkonen, O., and Turpeinen, M.: In vitro-in vivo extrapolation of hepatic clearance: biological tools, scaling factors, model assumptions and correct concentrations. Xenobiotica **37** (10-11)**:** 1066-1089, 2007.
- Pressman, B.: Ionophorous antibiotics as models for biological transport. *In* Federation proceedings, pp. 1283.
- Pressman, B. C., and deGuzman, N. T.: Biological applications of ionophores: theory and practice. Annals of the New York Academy of Sciences **Vol. 264:** 373-386, 1975.
- Pressman, B. C., and Fahim, M.: Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. Annual review of pharmacology and toxicology **22** (1)**:** 465-490, 1982.

- Ramsey, J. C., and Andersen, M. E.: A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. Toxicology and applied pharmacology **73** (1)**:** 159-175, 1984.
- Reyes-Herrera, I., Schneider, M. J., Cole, K., Farnell, M. B., Blore, P. J., and Donoghue, D. J.: Concentrations of antibiotic residues vary between different edible muscle tissues in poultry. Journal of Food Protection® **68** (10)**:** 2217-2219, 2005.
- Riviere, J. E.: Front Matter, Wiley Online Library, 2011.
- RNOEA, bulletin épidémiologique des pathologies aviaires, 2004
- Ross, R., Leger, L., Guardo, R., De Guise, J., and Pike, B. G.: Adipose tissue volume measured by magnetic resonance imaging and computerized tomography in rats. Journal of Applied Physiology **70** (5)**:** 2164-2172, 1991.
- Rostami-Hodjegan, A.: Physiologically based pharmacokinetics joined with in vitro–in vivo extrapolation of ADME: a marriage under the arch of systems pharmacology. Clinical Pharmacology & Therapeutics **92** (1)**:** 50-61, 2012.
- Rowland, M., Balant, L., and Peck, C.: Physiologically based pharmacokinetics in drug development and regulatory science: a workshop report (Georgetown University, Washington, DC, May 29–30, 2002). AAPS PharmSci **6** (1)**:** 56-67, 2004.
- Shlafer, M., Somani, P., Pressman, B. C., and Palmer, R. F.: Effects of the carboxylic ionophore monensin on atrial contractility and Ca 2+ regulation by isolated cardiac microsomes. Journal of molecular and cellular cardiology **10** (4)**:** 333-346, 1978.
- Simon, N., Le Guellec, C., and Laporte, S.: Analyse pharmacocinétique de population. Médecine thérapeutique **11** (3)**:** 212-218, 2005.
- Sørensen, J. T., Edwards, S., Noordhuizen, J., and Gunnarsson, S.: Animal production systems in the industrialised world. Rev sci tech Off int Epiz **25:** 493-503, 2006.
- Stange, K.: Angewandte Statistik, Springer Berlin, 1970.
- Stephan, B., Rommel, M., Daugschies, A., and Haberkorn, A.: Studies of resistance to anticoccidials in Eimeria field isolates and pure Eimeria strains. Veterinary Parasitology **69** (1)**:** 19-29, 1997.
- Stevens, D. A.: Coccidiosis. In: Delves, P.J., Roitt, I.M. (Eds.), Encyclopedia of Immunology, 2nd Edition. Vol. I, Academic Press, London, pp. 591–593., 1998.
- Teorell, T.: Kinetics of distribution of substances administered to the body, I: The extravascular modes of administration. Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie **57:** 205-225, 1937a.
- Teorell, T.: Kinetics of distribution of substances administered to the body, II: The intravascular modes of administration. Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie **57:** 226-240, 1937b.
- Todd, G., Novilla, M., and Howard, L.: Comparative toxicology of monensin sodium in laboratory animals. Journal of animal science **58** (6)**:** 1512-1517, 1984.
- Toutain, P. B.-M., A: Les modèles compartimentaux, DU pharmacocinétique Toulouse. 2007.
- Travis, C. C., White, R. K., and Ward, R. C.: Interspecies extrapolation of pharmacokinetics. Journal of theoretical biology **142** (3)**:** 285-304, 1990.
- Wang, X., Santostefano, M. J., DeVito, M. J., and Birnbaum, L. S.: Extrapolation of a PBPK model for dioxins across dosage regimen, gender, strain, and species. Toxicological Sciences **56** (1)**:** 49-60, 2000.
- Watier, J.-M.: Les coûts de supplementation en coccidiostatiques des aliments volailles : mise au point d'une méthode d'évaluation. 2011.
- Wideman, R. F.: Cardiac output in four-, five-, and six-week-old broilers, and hemodynamic responses to intravenous injections of epinephrine. Poultry science **78** (3)**:** 392-403, 1999.
- Yang, F., Huang, X., Li, G., Ni, H., Zhao, Y., Ding, H., and Zeng, Z.: Estimating tulathromycin withdrawal time in pigs using a physiologically based pharmacokinetics model. Food Additives & Contaminants: Part A **30** (7)**:** 1255-1263, 2013.

- Yang, F., Yang, Y., Wang, L., Huang, X., Qiao, G., and Zeng, Z.: Estimating marbofloxacin withdrawal time in broiler chickens using a population physiologically based pharmacokinetics model. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics **37** (6)**:** 579-588, 2014.
- Zhao, P., Rowland, M., and Huang, S. M.: Best practice in the use of physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation to address clinical pharmacology regulatory questions. Clinical Pharmacology and Therapeutics **92** (1)**:** 17-20, 2012.

SERMENT DE GALIEN

~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.
~~~~

Résumé

Les coccidioses sont unes des pathologies les plus fréquentes dans l'élevage aviaire. Pour limiter les pertes économiques, les éleveurs font appel à des anticoccidiens, comme le monensin, dont ils supplémentent l'alimentation des poulets. Mais ces poulets sont élevés pour leur chair, et il y a un risque pour le consommateur d'ingérer régulièrement ces produits. Pour limiter les risques, un temps d'attente est fixé, qui correspond au temps écoulé entre la dernière prise du principe actif et l'abattage des animaux. Ce calcul est effectué par régression linéaire. Mais une autre méthode de calcul innovante se développe : la pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK). Avec cette méthode, on s'affranchie de la description des jeux de données et des hypothèses émises lors de la régression linéaire. La PBPK, qui est basée sur des équations de transfert de masse, est un excellent outil de prédiction des concentrations. En l'alliant à une analyse de Monte-Carlo, qui est une technique probabiliste, on est capable de simuler les profils que l'on obtiendrait dans une population. Ainsi, par cette méthode, le calcul du temps d'attente est plus précis et indépendant des jeux de données.

Mots clés :

PBPK ; Monensin ; risque ; temps d'attente ; poulet