

Cinétiques de bactéricidie de la doxycycline vis-à-vis de souches porcines de *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Bordetella bronchiseptica*

Mireille GICQUEL (1), P. SANDERS (1), M. LAURENTIE (1), É. BOUSQUET (2)

(1) C.N.E.V.A., Laboratoire des Médicaments Vétérinaires - BP 203, 35302 Fougères Cedex

(2) VIRBAC, Direction de l'Information Médicale - BP 27, 06511 Carros Cedex

Cinétiques de bactéricidie de la doxycycline vis-à-vis de souches porcines de *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Bordetella bronchiseptica*

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) en doxycycline ont été déterminées par une méthode standard de dilution en bouillon avec *Pasteurella multocida* (8 souches), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (9 souches) et *Bordetella bronchiseptica* (6 souches), toutes isolées de l'appareil respiratoire de porcs. Toutes ces souches sont sensibles à la doxycycline avec des gammes de CMI respectivement de 0,03 - 0,25 ; 0,125 - 1 et 0,25 - 1 µg/ml pour Bb, Pm et Ap. Les cinétiques de bactéricidie de la doxycycline vis-à-vis des mêmes souches ont été déterminées pendant 24 h par microméthode. Pour les concentrations de doxycycline inférieures à la CMI un retard de croissance par rapport au témoin, d'autant plus important que la concentration est élevée, est observé pour l'ensemble des souches. Pour les concentrations comprises entre la CMI et 4 µg/ml, un effet bactériostatique est observé pendant la phase précoce (0 à 8 h), suivi par une décroissance de la population bactérienne jusqu'à 4 - 5 log UFC/ml pour Pm et Ap et jusqu'à 2 log UFC/ml pour Bb. La durée de la phase bactériostatique est d'autant plus courte que les concentrations sont élevées. Pour tous les germes, des concentrations plus élevées de doxycycline sont bactéricides dès la phase précoce. La doxycycline présente un effet bactéricide temps-dépendant pour des concentrations accessibles chez le porc et peut agir comme un antibiotique bactéricide concentration-dépendant pour des concentrations plus élevées. Le mode d'action bactéricide temps-dépendant de la doxycycline est compatible avec le profil pharmacocinétique d'un prémélange médicamenteux contenant cet antibiotique chez le porc.

Time-kill curves of doxycycline against porcine strains of *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of doxycycline were determined against strains of *Pasteurella multocida* (8 strains), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (9 strains) and *Bordetella bronchiseptica* (6 strains) according to a standard serial broth dilution method. All the strains were isolated from the respiratory tract of pigs. All the strains tested were susceptible to doxycycline with MIC values in the 0.03 - 0.25 µg/ml range against Bb, 0.125 - 1 µg/ml range against Pm and 0.25 - 1 µg/ml range against Ap. Time-kill curves of doxycycline against the same strains were then determined according to a broth microdilution test. For doxycycline concentrations below the MIC, a dose-related growth retarding effect compared to control culture was observed for all bacterial species. For doxycycline concentrations ranging between MIC and 4 µg/ml, a bacteriostatic effect was recorded during the early phase (0 to 8 h), followed by a decrease in the population size up to 4 to 5 log CFU/ml for Pm and Ap and up to 2 log CFU/ml for Bb. The duration of the bacteriostatic phase decreased with the increase in doxycycline concentrations. For all germs, higher concentrations were bactericidal from the early phase. Doxycycline exerts a time-dependent bactericidal effect for achievable drug levels in pigs, and may act as a concentration-dependent bactericidal antibiotic at higher concentrations. Time-dependent bactericidal action of doxycycline is consistent with pharmacokinetic profile of a doxycycline medicated pre-mix in pigs.

INTRODUCTION

La pathologie respiratoire, en particulier les infections respiratoires, constituent la cause essentielle des pertes économiques en élevage porcin liées à la mortalité, aux retards de croissance et aux lésions pulmonaires à l'abattage. Bien que l'origine de cette pathologie soit multifactorielle, l'utilisation d'anti-infectieux dans le traitement des affections respiratoires du porc est une nécessité, que les bactéries aient été les facteurs primitifs de la maladie ou seulement des agents de surinfection, les bactéries étant souvent responsables de la gravité de la maladie et/ou de son passage à la chronicité (BRUGÈRE-PICOUX et al, 1987).

Parmi les principaux germes impliqués dans les infections respiratoires du porc figurent *Pasteurella multocida* (pneumonies, rhinite atrophique), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (pleuropneumonie) et *Bordetella bronchiseptica* (rhinite atrophique). L'infection à *Mycoplasma hyopneumoniae* (agent causal de la pneumonie enzootique) prédispose par ailleurs le porc à une surinfection par *Actinobacillus pleuropneumoniae* ou *Pasteurella multocida* (KOBISCH, 1997).

Les tétracyclines sont largement utilisées en médecine porcine pour le traitement et la prévention des maladies respiratoires. Parmi les derniers composés synthétisés, la doxycycline présente une liposolubilité supérieure aux tétracyclines de 1ère génération. Ainsi, la doxycycline présente une activité antimicrobienne supérieure, une meilleure absorption orale et une diffusion tissulaire plus large (RIOND et RIVIERE, 1988). Une meilleure activité in vitro de la doxycycline a été démontrée vis-à-vis des pathogènes respiratoires porcins, comparée à l'oxytétracycline, la chlortétracycline et la tétracycline (BOUSQUET et al, 1997 ; PIJERS et al, 1989).

Parmi les méthodes d'étude in vitro de l'activité antibiotique, les résultats des antibiogrammes effectués sur les souches bactériennes isolées dans un élevage ou une région représentent une aide pour une stratégie thérapeutique. Par ailleurs, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des germes pathogènes sont comparées avec les concentrations de l'antibiotique dans l'organisme. Au cours de ces dernières années, les connaissances concernant l'ajustement de la posologie ont progressé de façon considérable à la faveur d'une approche dynamique consistant à mesurer l'effet de l'antibiotique sur une population bactérienne au cours du temps (SANDERS et GICQUEL, 1998). Les études pharmacodynamiques des antibiotiques ont montré tout l'intérêt de connaître la variation des cinétiques de bactéricidie en fonction de la concentration et des temps de contact afin de mieux définir le mode d'action d'un antibiotique (DRUGEON et al, 1990).

Il est généralement admis que l'activité de la doxycycline est essentiellement bactériostatique in vivo. Cependant on a démontré un effet bactéricide sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* à des concentrations supérieures à la CMI (HEMAN-ACKAH, 1976). L'objectif de cette étude est de décrire l'activité in vitro de la doxycycline au cours du temps vis-à-vis des principaux pathogènes respiratoires porcins (*Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Bordetella bronchiseptica*) sur des souches isolées de cas cliniques terrain. L'interprétation pratique des courbes devra permettre de mieux utiliser la doxycycline en relation avec la pharmacocinétique chez l'animal.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes testées, à la fois pour la détermination des CMI et l'obtention des cinétiques de bactéricidie, ont été isolées en 1993 à partir de porcs atteints de pathologie respiratoire par le Laboratoire Départemental d'Analyse des Côtes d'Armor (LDA22). Elles comprenaient 8 souches de *Pasteurella multocida* (Pm) non toxigènes, dont 7 de type capsulaire A et une de type capsulaire D qui ont été respectivement isolées des poumons et des cavités nasales ; 9 souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Ap) de biovar 1 isolées des poumons, de sérovars divers (S2, S7, S9, S11 ou S12) ; et 6 souches de *Bordetella bronchiseptica* (Bb) isolées des cavités nasales de porcs infectés.

Avant chaque étude, les souches conservées à -80°C sont mises en culture sur des géloses supplémentées en fonction des besoins spécifiques de chaque type bactérien.

1.2. Antibiotique

Une gamme d'antibiotique est réalisée à partir d'une solution mère de doxycycline hyclate en réalisant des dilutions de raison 2 dans le bouillon de culture correspondant à chaque type bactérien, respectivement le bouillon Müller Hinton (BMH) pour Pm et Bb, et le bouillon Pleuro-Pneumonia-Like Organisms (PPLO) pour Ap.

1.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI avec la doxycycline a été effectuée par la méthode de dilution en bouillon de culture selon les normes standard américaines (NCCLS, 1991).

Les CMI sont réalisées en microméthode avec un inoculum de 10^5 ou 10^7 bactéries/ml. Pour chacune des souches, 11 concentrations de doxycycline comprises entre 0,03 et 32 µg/ml sont testées simultanément ainsi qu'un témoin sans antibiotique. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C, la première concentration d'antibiotique ne montrant pas de trouble visible à l'œil nu correspond à la CMI.

La méthode a été validée avec une souche de référence (*Escherichia coli* American Type Culture Collection [ATCC] 25922).

1.4. Cinétiques de bactéricidie

Les cinétiques de bactéricidie sont réalisées par microméthode, d'après une technique déjà développée au laboratoire (RENARD et al, 1996), en testant simultanément 11 concentrations de doxycycline comprises entre 0,03 et 32 µg/ml et un témoin sans antibiotique par souche bactérienne.

Un inoculum d'environ 10^7 bactéries/ml est préparé à partir de bactéries en phase stationnaire de croissance, dans un bouillon de culture supplémenté en fonction des besoins spécifiques de chaque type bactérien. Puis, il est mis en contact avec la gamme d'antibiotique à T0 et incubé pendant toute la durée de la cinétique (24 heures pour les bactéries testées). Le dénombrement des bactéries survivantes, au cours de la cinétique, est réalisé par des prélèvements qui sont dilués et repiqués sur des milieux de culture spécifiques de

chaque type bactérien, contenant des inhibiteurs d'antibiotique (charbon actif et sulfate de magnésium). Le comptage des colonies est réalisé après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C des géloses de dénombrement. Les résultats (moyenne des repiquages) sont exprimés en Unité Formant une Colonie (UFC)/ml. La limite de détection correspond à 70 bactéries/ml sauf à 24 heures où elle est de 10 bactéries/ml.

2. RÉSULTATS

2.1. CMI

Toutes les souches testées sont sensibles à la doxycycline. Avec un inoculum de 10⁵ bactéries/ml, les CMI sont comprises entre 0,03 et 0,25 µg/ml, 0,125 et 1 µg/ml et 0,25 et 1 µg/ml, respectivement vis-à-vis de *Bb*, *Pm* et *Ap* (figure 1).

Figure 1 - CMI de la doxycycline vis-à-vis de souches porcines de *Pm* (n=8), *Ap* (n=9) et *Bb* (n=6) pour un inoculum de 10⁵ bactéries/ml.

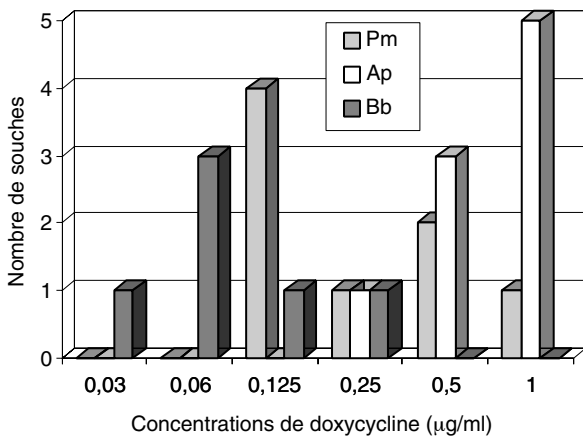
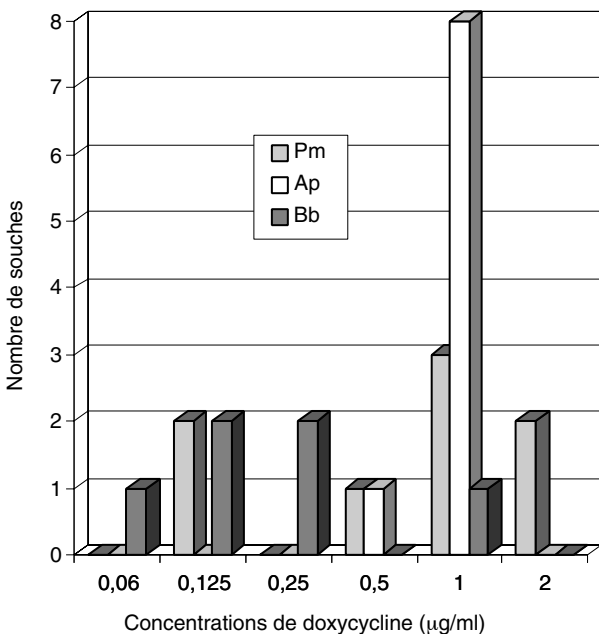


Figure 2 - CMI de la doxycycline vis-à-vis de souches porcines de *Pm* (n=8), *Ap* (n=9) et *Bb* (n=6) pour un inoculum de 10⁷ bactéries/ml.



Avec un inoculum à 10⁷ bactéries/ml, les CMI sont comprises entre 0,06 et 1 µg/ml, 0,125 et 2 µg/ml et 0,5 et 1 µg/ml, respectivement vis-à-vis de *Bb*, *Pm* et *Ap* (figure 2).

2.2. Cinétiques de bactéricidie

Les figures 3, 4 et 5 montrent les cinétiques de bactéricidie de l'ensemble des concentrations de doxycycline testées pour une souche représentative de chaque espèce bactérienne de *Pm*, *Ap* et *Bb*, respectivement.

Figure 3 - Cinétiques de bactéricidie de la doxycycline vis-à-vis d'une souche porcine de *Pasteurella multocida*

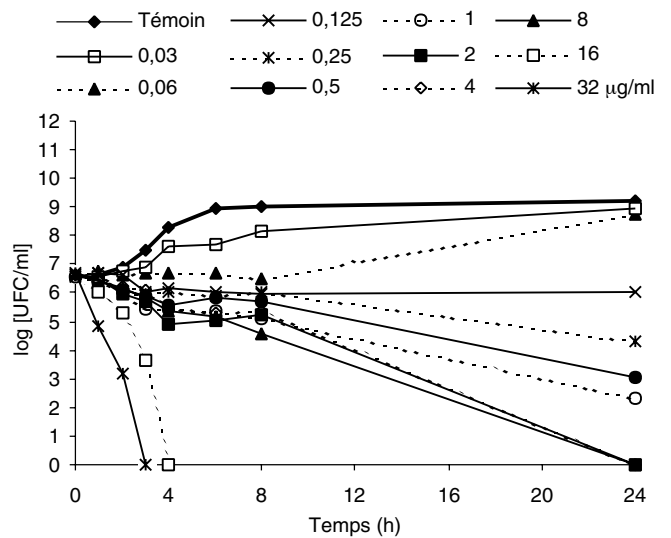
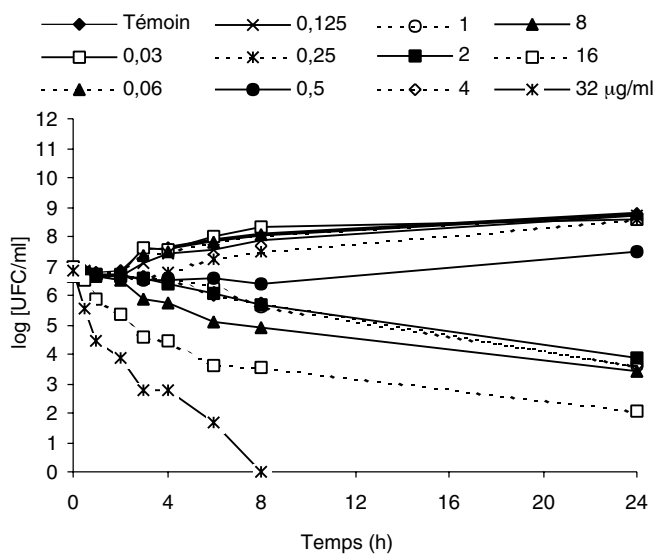


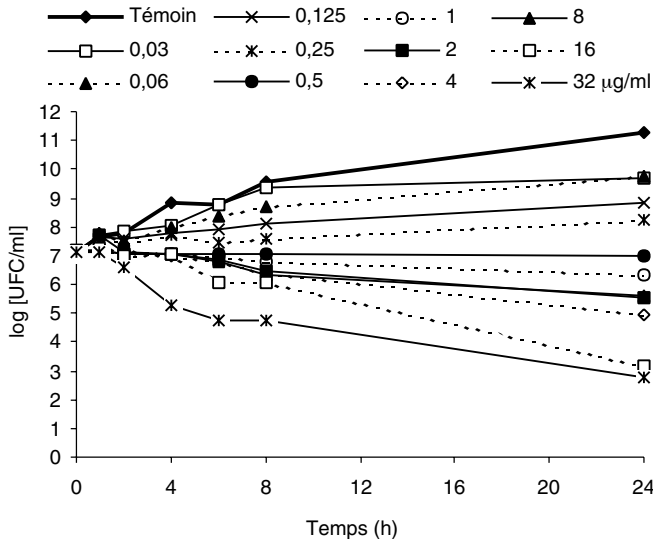
Figure 4 - Cinétiques de bactéricidie de la doxycycline vis-à-vis d'une souche porcine d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*



Pour les concentrations de doxycycline inférieures à la CMI, ou concentrations subinhibitrices, il y a un retard de croissance par rapport à la courbe témoin pour les 3 espèces bactériennes testées, avec généralement un allongement de la phase de latence. Cette phase de latence correspond à

une phase stationnaire, précédant la phase exponentielle de croissance, qui doit permettre la synthèse des éléments nécessaires à cette croissance. Ce retard de croissance est d'autant plus important que la concentration est élevée.

Figure 5 - Cinétiques de bactéricidie de la doxycycline vis-à-vis d'une souche porcine de *Bordetella bronchiseptica*



Les concentrations comprises entre la CMI et 4 µg/ml sont bactériostatiques pendant la phase précoce jusqu'à environ 8 heures. La durée de la phase bactériostatique peut diminuer avec l'augmentation des concentrations de doxycycline testées. Puis, une bactéricidie est observée pendant la phase tardive jusqu'à 24 heures, qui varie en fonction des concentrations et des souches testées, pouvant aller jusqu'à une réduction de 4 à 5 log UFC/ml pour *Pm*, 4 log pour *Ap* et 2 log pour *Bb*. Cela correspond à une bactéricidie de type temps-dépendant où l'effet bactéricide dépend plus du temps d'exposition de la bactérie à l'antibiotique que de la concentration en antibiotique.

Les concentrations de doxycycline supérieures ou égales à 8 µg/ml sont bactéricides pour les 3 espèces bactériennes testées. La bactéricidie est d'autant plus importante que la concentration en doxycycline est élevée (bactéricidie de type concentration-dépendant), pouvant dans certains cas entraîner la stérilité de l'inoculum à 24 heures ou pendant la phase précoce uniquement pour *Pm* et *Ap*.

DISCUSSION - CONCLUSION

L'objectif de l'étude était de décrire l'activité de la doxycycline *in vitro* vis-à-vis des principales souches pathogènes respiratoires retrouvées chez le porc afin de mettre ces résultats en relation avec la pharmacocinétique de cet antibiotique dans cette espèce.

La première étude a consisté à évaluer la sensibilité des souches à la doxycycline en déterminant leur CMI. Les souches testées, toutes sensibles à la doxycycline, présen-

tent des valeurs de CMI du même ordre de grandeur que celles précédemment décrites (PIJPERS et al, 1989 ; BOUSQUET et al, 1997).

L'étude principale consistait à évaluer l'action de la doxycycline au cours du temps afin de mieux définir le mode d'action dynamique de l'antibiotique. Des courbes de bactéricidie ont été obtenues en fonction du temps et de la concentration d'antibiotique. Le mécanisme d'action des tétracyclines est connu, elles inhibent la synthèse protéique en se fixant au niveau du ribosome, et donnent ainsi un effet bactériostatique. Mais, il a été mis en évidence une production de radicaux oxygénés qui pourraient intervenir, dans certaines conditions, pour donner un effet bactéricide (MICHEL-BRIAND, 1990).

Dans cette étude, la doxycycline présente 3 grands types d'action qui dépendent des concentrations testées pour les 3 espèces bactériennes. Un effet subinhibiteur entraînant un retard de croissance est observé en présence de concentrations inférieures à la CMI. L'existence de ces effets sub-inhibiteurs, qui perturbent le métabolisme bactérien, peut jouer un rôle dans la guérison clinique. En effet, ces faibles concentrations peuvent rendre les bactéries plus sensibles à la réponse immunitaire (SANDERS et GICQUEL, 1998). Un effet bactéricide temps-dépendant est observé en présence de concentrations supérieures ou égales à la CMI correspondant à des concentrations accessibles *in vivo*. Cependant, cet effet est moins important pour les souches de *Bb* par rapport à celles de *Pm* et *Ap* avec une réduction maximale de 2 log UFC/ml. Enfin, un effet bactéricide concentration-dépendant est observé en présence de concentrations supérieures ou égales à 8 µg/ml qui ne sont pas retrouvées *in vivo*.

La pharmacocinétique d'un prémélange médicamenteux à base de doxycycline chez le porc dans le plasma et l'appareil respiratoire est compatible avec le mode d'action temps-dépendant de cet antibiotique sur les pathogènes respiratoires du porc (BOUSQUET et al, 1998).

Jusqu'à ces dernières années, les schémas posologiques des médicaments anti-microbiens en thérapeutique humaine et vétérinaire étaient déterminés en tenant compte de l'évolution des concentrations plasmatiques et de l'activité microbiologique *in vitro* évaluée par des méthodes statiques (déterminations des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides). Cependant, l'intérêt de développer des tests dynamiques pour mesurer l'effet d'un antibiotique sur une population bactérienne au cours du temps par les techniques de bactéricidie a été démontré pour mieux optimiser les traitements antibiotiques face à la montée de l'antibiorésistance et pour éviter les échecs thérapeutiques notamment chez les sujets immunodéprimés. L'amélioration des connaissances en antibiologie a amené à une optimisation raisonnée des posologies d'antibiotique fondée sur les concepts d'effet bactéricide temps- ou concentration-dépendant et sur la connaissance de leur distribution tissulaire (SANDERS et GICQUEL, 1998). Les données présentées dans cette étude illustrent un cas d'application aux traitements collectifs par voie orale chez le porc.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOUSQUET É., MORVAN H., AITKEN I., MORGAN J.H., 1997. *Vet. Rec.*, 141, 37-40.
- BOUSQUET É., NOUWS J., TERLOUW P., DE KLEYNE S., 1998. *Vet. Res.*, 29 (5), 475-485.
- BRUGÈRE-PICOUX J., BRUGÈRE H., VILLEMEN P., 1987. *Rec. Méd. Vét.*, 163 (4), 485-511.
- DRUGEON H.B., LEGALLOU F., CAILLON J., 1990. In : "Bactéricidie". 113-126. Maloine éd., Paris.
- HEMAN-ACKAH S.M., 1976. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10, 223-228.
- KOBISCH M., 1997. *Point Vét.*, 28, 1081-1084.
- MICHEL-BRIAND Y., 1990. In ; "Bactéricidie". 107-111. Maloine éd., Paris.
- NCC LS Document M7-A2, 1991. American National Standard, Villanova, 10 (8).
- PIJERS A., VAN KLINGEREN B., SCHOEVERS E.J., VERHEIJDEN J.H.M., VAN MIERT A.S.J.P.A.M., 1989. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 12, 267-276.
- RENARD L., GICQUEL M., LAURENTIE M., SANDERS P., 1996. *Vet. Res.*, 27, 23-32.
- RIOND J.L., RIVIERE J.E., 1988. *Vet. Hum. Toxicol.*, 30 (5), 431-443.
- SANDERS P., GICQUEL M., 1998. *Point Vét.*, 29 (190), 227-236.