

# Pharmacocinétique digestive de la bacitracine chez le lapin après administration continue par l'eau de boisson d'une spécialité pharmaceutique hydrosoluble. Mesure de la biodisponibilité systémique et des résidus tissulaires.

P. RICHEZ<sup>1</sup>, A. RICHARD<sup>2</sup>, B. CORNEZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>TransPharm, St Geniès des Mourgues, F-34160, France

<sup>2</sup>Alpharma, Verrière le Buisson, F-91374, France

<sup>3</sup>Alpharma, Anvers, B-2610, Belgique

**Résumé :** La bacitracine a été administrée en continu dans l'eau de boisson à 4 groupes de lapins en croissance aux doses de 105, 210, 420 ou 840 UI/kg de poids corporel sous une forme hydrosoluble (Bacivet®-S) pendant 7 jours. Les prélèvements de caecum collectés aux temps 0 ; 4 ; 8 ; 12 et 24 heures des 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours après le début de l'administration ont été soumis à analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS). Les résultats obtenus montrent qu'à la dose de 420 IU/kg/jour les teneurs en bacitracine caecale se sont maintenues à une valeur supérieure à la Concentration Minimale Bactéricide (CMB<sub>90</sub>). Par ailleurs, après 30 jours de traitement à une dose de 420 UI/kg, les taux sanguins étaient inférieurs à la limite de détection de la méthode (< 37.5 µg/L). Ceci s'est traduit par l'absence de résidus tissulaires, aucun prélèvement ne contenant de traces de bacitracine (<75 µg/kg) dès le premier temps de prélèvement, le lendemain de l'arrêt du traitement.

**Abstract. Bacitracin digestive pharmacokinetics in rabbits after continuous administration through drinking water of a hydrosoluble veterinary medicinal product. Systemic bioavailability and tissue residues determination.** Bacitracin was administered continuously through drinking water in four groups of growing rabbits at doses of 105, 210, 420 or 840 IU/kg b.w. using a hydrosoluble medication (Bacivet®-S) for seven consecutive days. Coecal samples were taken at times 0, 4, 8, 12 and 24 hours on days 3 and 7 of medication. These samples were analysed using liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection (LC/MS/MS). The results obtained showed that caecal bacitracin concentrations remained constantly above the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) at the dose of 420 IU/kg b.w. In addition, after 30 days of continuous administration at 420 IU/kg b.w., blood concentrations remained below the detection limit (< 37.5 µg/L). As a consequence, no residues were found (< 75 µg/kg) from the first day after treatment withdrawal in any edible tissue.

## Introduction

La bacitracine zinc est indiquée chez les lapins en croissance pour réduire les signes cliniques et la mortalité dus à l'entérococolite épizootique associée aux infections à *Clostridium perfringens* sensibles à la bacitracine. Le traitement doit être instauré en cas d'antécédents historiques d'entérococolite épizootique dans l'élevage et dès les premières morts confirmées. La bacitracine est un antibiotique polypeptidique constitué par un mélange de plusieurs polypeptides étroitement liés. Elle s'oppose à la biosynthèse au niveau de la paroi cellulaire en inhibant la pyrophosphatase impliquée dans le transport transmembranaire des précurseurs des peptidoglycans (EMEA, 2001 ; Chambers, 2001). Le sel de zinc assure la stabilité de la substance active pendant sa conservation. La bacitracine possède des propriétés bactéricides vis-à-vis coques et bacilles à Gram positif, en particulier certaines espèces de clostridies (Jawatz, 1995).

Le but de cette étude était de déterminer *in vivo* (i) le profil pharmacocinétique de la bacitracine dans le caecum (ii) sa biodisponibilité systémique (passage dans le compartiment sanguin) et (iii) la teneur en résidus tissulaires après administration en continu

dans l'eau de boisson d'une forme pharmaceutique hydrosoluble chez des lapins sains.

## 1. Matériel et méthodes

Un total de 88 lapins New Zealand White (44 mâles et 44 femelles) âgés de 5 semaines ont reçu de la bacitracine zinc par voie orale en continu dans l'eau de boisson, sous forme de Bacivet®-S (Alpharma, Verrière le Buisson, F-91374) pendant 7 jours consécutifs à 4 niveaux de dose : 105, 210, 420 et 840 UI/kg de poids corporel/jour (respectivement 1.7, 3.4, 6.8 et 13.5 mg de bacitracine/kg, sur la base de 62 UI/mg pour le lot considéré). Les concentrations dans l'eau de boisson étaient ajustées quotidiennement en fonction de la concentration hydrique des jours précédents. Des mesures de concentrations effectives en bacitracine dans l'eau de boisson ont confirmé l'exactitude des doses administrées. Les animaux ont été sacrifiés par groupes de 4 au troisième jour et au septième jour du traitement aux temps 0 (8h le matin), 4h, 8h, 12h et 24h après le début de la distribution d'eau supplémentée. La teneur en bacitracine a été mesurée dans le caecum de chaque animal en faisant appel à une technique originale spécifique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS) après ionisation en

interface electro-spray (ESI). La bacitracine a été extraite du contenu du caecum en utilisant un mélange méthanol/eau/acide acétique (90/9/1). Le surnageant a été centrifugé, puis dilué et acidifié avant d'être analysé. La quantification était exprimée en bacitracine totale à partir des aires de pic correspondant aux deux fractions principales (bacitracine A et B), sur la base d'un lot de bacitracine titrant 62 UI/mg.

Seize autres lapins, 8 mâles et 8 femelles, ont ensuite reçu 420 UI/kg de bacitracine zinc par voie orale dans l'eau de boisson sous forme de Bacivet®-S pendant 30 jours (du jour 11 au jour 41 après sevrage). Les teneurs en bacitracine ont été dosées dans le plasma, les reins, le foie, le muscle squelettique et la graisse abdominale prélevés 24, 48, 72 et 96 heures après le retrait du traitement. Les dosages ont été réalisés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS-MS, ESI) selon une technique comparable à celle décrite pour les prélèvements caecaux. La technique a été validée pour le dosage dans ces tissus avec une limite de quantification de 37.5 µg/kg. Les concentrations caecales individuelles ont été utilisées à chaque temps d'examen pour établir l'intervalle de confiance correspondant ( $p = 0.95$ ). Le critère d'efficacité était représenté par le maintien de la limite basse de cet intervalle en deçà du seuil des concentrations inhibitrices ou bactéricides. Les concentrations moyennes ont été comparées entre elles par analyse de la variance suivie d'une comparaison multiple par le test de Newman-Keuls permettant la comparaison entre concentrations à un temps donné ou la comparaison entre différents temps d'examen pour une dose donnée.

## 2. Résultats

Les techniques analytiques mises en œuvre ont été validées selon les critères suivants : sélectivité pour la bacitracine par rapport aux autres composants de la matrice testée, linéarité dans un domaine compris entre la limite de quantification (37.5 µg/kg pour le plasma, 75 µg/kg pour les tissus et 200 µg/kg pour le contenu caecal), précision (écart-type relatif de répétabilité/reproductibilité n'excédant pas 15%), exactitude (le taux de recouvrement restait proche de 100%). Les valeurs moyennes de concentrations en

bacitracine dans le caecum aux différents temps de prélèvement sont indiquées dans le tableau 1. Les valeurs obtenues au 3<sup>ème</sup> et au 7<sup>ème</sup> jour, n'étant pas statistiquement différentes, ont été regroupées dans le calcul des valeurs moyennes.

Ces valeurs ont été portées dans la Figure 1, qui montre les valeurs seuils représentant les valeurs de Concentration Minimale Inhibitrice (CMI<sub>90</sub>) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB<sub>90</sub>) souhaitables (Richez *et al.*, 2007), respectivement 930 et 1860 µg/kg. La courbe moyenne suit une variation au cours du nyctémère, avec un plateau observé entre les temps 4 et 12 heures correspondant globalement à la période diurne, la phase post-nocturne (temps 0 et 24h) se traduisant par les valeurs les plus basses, probablement en relation avec une consommation hydrique moindre en période nocturne. Le seuil de CMB<sub>90</sub> de 1830 µg/kg n'a pas été maintenu pendant toute la durée du nyctémère aux doses de 105 et 210 UI/kg. En revanche, la dose de 420 UI/kg a permis le maintien de ce seuil même en fin de nuit (temps 0 et 24h). La dose de 840 UI/kg conduisait de façon constante à des niveaux supra-bactéricides, le niveau atteint étant de l'ordre de 2 à 4 fois supérieur à la CMB<sub>90</sub>.

Les analyses effectuées après 30 jours de traitement à une dose de 420 UI/kg indiquaient l'absence de concentration mesurable en bacitracine dans le plasma, montrant ainsi une biodisponibilité systémique nulle sur la base d'une limite de quantification de 37.5 µg/l.

Les analyses effectuées dans les tissus montraient de la même façon l'absence de pic mesurable de bacitracine (limite de quantification de 75 µg/kg), quel que soit le temps d'examen (entre 1 et 4 jours après le retrait du traitement) après 30 jours de traitement continu.

## 3. Discussion

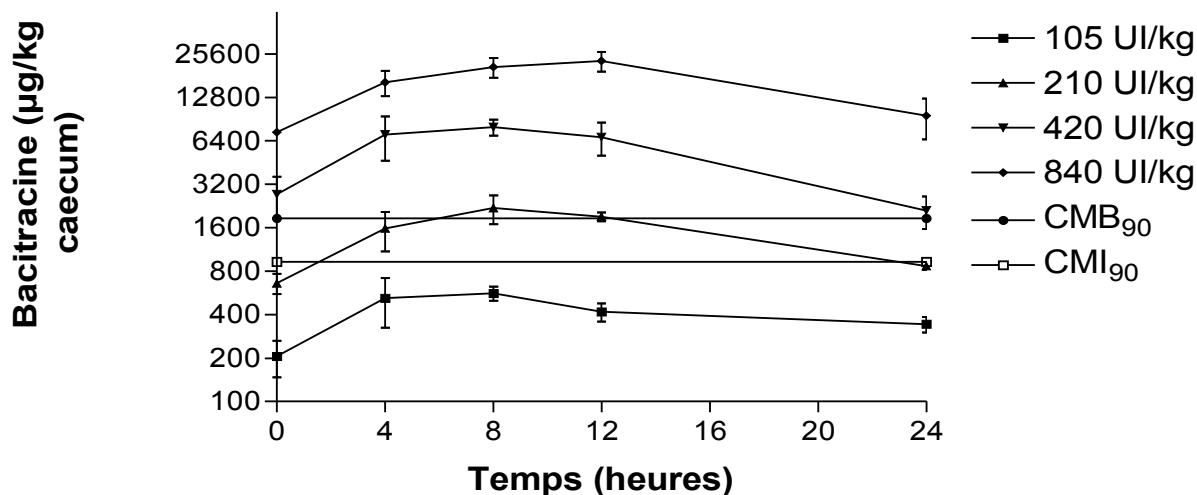
Ces résultats montrent que la bacitracine n'est pas absorbée par voie digestive sur la base d'une technique analytique disposant d'une limite de quantification relativement basse (37.5 µg/kg). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment chez le porc, le poulet et le rat (Butaye *et al.*, 2003 ; Froyshov *et al.*, 1986). Cette absence

**Tableau 1.** Concentrations moyennes ± écart-type de la moyenne en bacitracine dans le caecum aux différents temps de prélèvements (J3 et J7 regroupés, n = 8), en µg/kg de contenu caecal.

Dose/jour	105 UI/kg		210 UI/kg		420 UI/kg		840 UI/kg	
	M	ETM	M	ETM	M	ETM	M	ETM
Temps (h)								
0	205.75	58.3072	661.5	104.9591	2731.25	872.335	7332.5	358.1521
4	520.5	195.1139	1582.5	483.5074	7062.5	2414.534	16290	3269.725
8	563.25	63.81402	2192.5	500.2562	7982.5	1019.137	20772.5	3269.086
12	418.5	60.85844	1905	133.5727	6807.5	1756.86	22975	3597.54
24	343.25	42.21448	869.75	54.70889	2102	530.4313	9545	2999.724

M = valeur moyenne (n = 4), ETM = écart-type de la moyenne (n = 8)

**Figure 1.** Représentation graphique des concentrations moyenne ( $\pm$  écart-type de la moyenne) en bacitracine dans le caecum aux différents temps de prélèvements (J3 et J7 regroupés, n = 8), en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de contenu caecal à 4 niveaux de dose, de 105 à 840 UI/kg de poids corporel par jour.



apparente d'absorption peut, au moins en partie, s'expliquer par le caractère macromoléculaire de la bacitracine qui a un poids moléculaire de 1422 daltons (bacitracine A) et par ses propriétés physico-chimiques : forte hydrosolubilité, faible lipophilie, pKa de 5.5 conduisant à une forte ionisation aux niveaux de pH du système digestif (pH 6 à 8 en moyenne) et donc à une probabilité d'absorption encore plus faible. Cette absence apparente d'absorption se traduit par des concentrations tissulaires inférieures à la limite de quantification dans les tissus consommables (muscle, foie, rein, graisse) dès le premier temps d'examen mis en œuvre dans cette étude (24 heures après le retrait du traitement). Il en résulte qu'un délai d'attente court entre l'arrêt du traitement et l'abattage des animaux permettra la consommation de la viande et des abats sans risque pour le consommateur (les limites maximales de résidus sont en Europe de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dans les tissus de lapin ; Règlement du Conseil de l'Europe, 2003).

La bacitracine ingérée par l'eau de boisson subit une forme de capture ionique dans le contenu digestif, conduisant au maintien de concentrations relativement constantes en forme libre (non liée) pendant toute la durée du nyctémère, sans accumulation entre le 3<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour de traitement. Le calcul de la posologie optimale pour la bacitracine, antibiotique bactéricide de type concentration-indépendant, sur des bases pharmacocinétiques / pharmacocinétiques (PK/PD), doit considérer la dose permettant le maintien de concentrations au moins égales à la CMB<sub>90</sub> pendant toute la durée du traitement (McKellar, 2004).

### Conclusion

Cette étude montre qu'une dose quotidienne de 420 UI/kg permet le maintien de concentrations au moins

égales à la CMB<sub>90</sub> pendant toute la durée du traitement. La durée du traitement n'est toutefois pas un paramètre dérivé des analyses PK/PD et doit donc faire l'objet d'études cliniques de terrain, hors du cadre des présents travaux. L'administration prolongée à cette même dose ne conduit pas à des niveaux mesurables de résidus tissulaires, du fait d'une biodisponibilité systémique nulle aux seuils de détection obtenus.

### Références

- BUTAYE P., DEVRIESE L.A., HAESBROUCK F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(2):175-188
- CHAMBERS H.F. 2001. Bacitracin, in *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics* 10<sup>th</sup> ed. J.G. Hardman & L.E. Limbird Eds., McGraw Hill, New York, USA, 1265-1266.
- FROYSHOV, O., PEDERSEN S., HOVE D K., 1986. Absorption, metabolism and excretion of zinc C<sup>14</sup>-bacitracin fed to young pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 55:100-110.
- JAWATZ E. 1995. Bacitracin, in *Basic and Clinical Pharmacology* 6<sup>th</sup> ed. Katzung B.G. Ed., Appleton & Lange, East Norwalk, USA, 739.
- McKELLAR Q.A., SANCHEZ BRUNI S.F., JONES D.G. 2004. Pharmacokinetic/ pharmacokinetic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 27(6):503-514.
- REGLEMENT DU CONSEIL DE L'EUROPE No. 2377/90/EC, amendée par le règlement No. 544/2003/EC date du 27 mars 2003.
- RICHEZ P., RICHARD A., CORNEZ B. 2007. Sensibilité, résistance et profil de bactéricidie de la bacitracine vis-à-vis de souches de *Clostridium perfringens* isolées lors de cas cliniques d'Entérocologie Epizootique du Lapin. 12<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, 27-28 novembre 2007.
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (2001) – Committee for Veterinary Medicinal Products - Bacitracin: summary report (2) – EMA/MRL/768/00-FINAL (January 2001).

