



Usages de la colistine en médecine humaine et vétérinaire : exploration pharmacocinétique et problématique d'antibiorésistance

Alexis Viel

► To cite this version:

Alexis Viel. Usages de la colistine en médecine humaine et vétérinaire : exploration pharmacocinétique et problématique d'antibiorésistance. Pharmacologie. Université de Poitiers, 2017. Français. NNT : . tel-02534138

HAL Id: tel-02534138

<https://hal.science/tel-02534138>

Submitted on 6 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

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

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Pharmacie

Présentée par :
Alexis Viel

Usages de la colistine en médecine humaine et vétérinaire : exploration pharmacocinétique et problématique d'antibiorésistance

Directeur(s) de Thèse :
Nicolas Grégoire, Jérôme Henri

Soutenue le 12 décembre 2017 devant le jury

Jury :

Président	William Couet	Professeur des Universités, PH, Université de Poitiers
Rapporteur	Alain Bousquet-Mélou	Professeur, École nationale vétérinaire de Toulouse
Rapporteur	Patrick de Backer	Professor, Ghent university, Belgium
Membre	Nicolas Grégoire	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Jérôme Henri	Chargé de recherche, ANSES, Fougères
Membre	Michel Laurentie	Directeur de recherche, ANSES, Fougères
Membre	Frédéric Bois	Directeur de recherche, INERIS, Verneuil-en-Hallate

Pour citer cette thèse :

Alexis Viel. *Usages de la colistine en médecine humaine et vétérinaire : exploration pharmacocinétique et problématique d'antibiorésistance* [En ligne]. Thèse Pharmacie. Poitiers : Université de Poitiers, 2017. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

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

Ecole Doctorale : n°524 Bio-santé du PRES Limousin-Poitou-Charentes

Secteur de Recherche : Pharmacie

Présentée par :

Alexis VIEL

Usages de la colistine en médecine humaine et vétérinaire :
exploration pharmacocinétique et problématique d'antibiorésistance

Directeurs de Thèse :

Docteur Nicolas GREGOIRE

Docteur Jérôme HENRI

Soutenue le 12 décembre 2017
devant la Commission d'Examen

JURY

Professeur Alain BOUSQUET-MELOU	Rapporteur
Professeur Patrick DE BACKER	Rapporteur
Docteur Frédéric BOIS	Examineur
Professeur William COUET	Examineur
Docteur Michel LAURENTIE	Examineur
Docteur Nicolas GREGOIRE	Directeur de thèse
Docteur Jérôme HENRI	Co-directeur de thèse

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

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

Ecole Doctorale : n°524 Bio-santé du PRES Limousin-Poitou-Charentes

Secteur de Recherche : Pharmacie

Présentée par :

Alexis VIEL

Usages de la colistine en médecine humaine et vétérinaire :
exploration pharmacocinétique et problématique d'antibiorésistance

Directeurs de Thèse :

Docteur Nicolas GREGOIRE

Docteur Jérôme HENRI

Soutenue le 12 décembre 2017
devant la Commission d'Examen

JURY

Professeur Alain BOUSQUET-MELOU	Rapporteur
Professeur Patrick DE BACKER	Rapporteur
Docteur Frédéric BOIS	Examineur
Professeur William COUET	Examineur
Docteur Michel LAURENTIE	Examineur
Docteur Nicolas GREGOIRE	Directeur de thèse
Docteur Jérôme HENRI	Co-directeur de thèse

Remerciements

Au Pr Patrick De Backer, au Pr Alain Bousquet-Mélou et au Dr Frédéric Bois, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail. Hommages respectueux.

Au Professeur William Couet et au Dr Michel Laurentie, pour m'avoir fait confiance et accepté au sein de leurs unités respectives, pour leurs précieux conseils et leur recul sur ce travail, et enfin pour me donner l'opportunité de pouvoir continuer sur d'autres projets après cette thèse. Sincères remerciements.

Au Dr Jérôme Henri et au Dr Nicolas Grégoire, pour votre disponibilité, votre patience et vos conseils. Vous avez toujours répondu présents pour m'aider à surmonter les problèmes. J'ai également énormément appris à vos côtés. Que vous trouviez ici l'expression de toute ma reconnaissance.

A Agnès Perrin-Guyomard, qui m'a encadré et énormément épaulé pour toute la partie microbiologie de cette thèse. Même si tu n'es pas officiellement co-directrice de thèse, ton implication m'a été indispensable pour mener à bien ce travail. Que tu trouves ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Au Dr Pascal Sanders, pour m'avoir accepté comme doctorant au laboratoire de Fougères et me donner l'opportunité d'y retourner pour d'autres projets. Hommage respectueux.

A toutes celles et ceux qui ont aidé à la réalisation de cette thèse et notamment pour la partie expérimentale :

- ❖ Jean-Guy et Jacqueline, pour toute la partie expérimentation animale qui a été intense parfois ! Merci d'être venus même tard dans la nuit ou le weekend.
- ❖ Patrice et Julian pour l'énorme partie analytique, ainsi que Christophe et Guillaume qui ont aidé pour tous les dosages.
- ❖ l'équipe AB2R : Pamela et Anne que j'ai le plus sollicitées, et aussi Karine, Catherine, Mireille et Stérenn. Merci à toutes !
- ❖ Alain et Sylvie, toujours prêts à me rendre service et me dépanner en urgence pour la partie logistique et matériel !

❖ Tous les autres qui m'ont aidé quand cela sortait de mon domaine de compétence : Rachel, Antoine, Sophie, Mélaine, Sandrine, Sir Julien...

Pour toutes les rencontres durant ces années de thèse :

➤ Au laboratoire Anses de Fougères :

La team de thésards et stagiaires : Romain (copain de charcuterie, de poésie et de Nuit veto), Kahina (reine des chats), Jim (Le Van Dame de la blague), Pegzillah, Berg' la mouette, Vincent (alias Grognon), Princesse Sarah, Pierrot le rigolo (l'équivalent de Jul pour les blagues), Lisa, Océane, Isabau (Reine des P), BenJ, PJ (notre initiateur au squash).

Les moins jeunes (mais tout aussi sympathiques !) : Maman Rachel (reine des mojitos) et Mamie Estelle (reine des cookies), MikL (padawan du squash)

Et à tous ceux du laboratoire qui m'ont bien accueilli et avec qui il est agréable d'échanger.

➤ Au laboratoire Inserm de Poitiers :

Les jeunes : Matthieu (Top veto PK d'élite), Vinz (médaille suprême de R, NONMEM et de la mass balance), Etienne (Doc Cortico), Emma (la reine du froufrou), Alexia la kidnapeuse, Bruna (reine des petits pois !), Julia (notre allemande préférée), Marisa (notre portugaise préférée), les frères Brunet (entraînez-vous donc au squash), Sophie la pictarisienne, Betty, Hari, Sachi pour le partage de leur culture.

Les 2 phénomènes : Agnès et Muriel alias Tic et Taz.

Les « autres » Inserm : Adélie, Obélia, et Manu, mes comparses de ~~vacances~~ formation à Bordeaux.

A mes amis veto qui n'ont toujours pas compris pourquoi je faisais une 2^e thèse, mais qui sont toujours là quand il le faut : les chouchoux (Tim, Tibo, Mary, Nico, Cocci), les Kidpomp (Mich, PM, Pierre, Itan, Dani, Pauline), les poulottes timbrées (Dridri, Douve, Coco), Vavie (qui elle a compris !), Caro et Jessi (mes autres allemandes préférées).

A Charlotte, merci pour la relecture.

A la SFNL, avec une mention spéciale pour DBL, Pies et AntipaGui.

A mes proches et ma famille, et spécialement ma mère, ma sœur et mes 2 neveu et nièce.

A mon père.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des publications et communications	7
Liste des abréviations	8
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux.....	11
Liste des Annexes	11
INTRODUCTION	12
I. Première partie : Synthèse bibliographique	14
1. Un vieil antibiotique : la colistine et sa prodrogue, le colistine méthanesulfonate	15
1.1. <i>Structure chimique</i>	15
1.2. <i>Propriétés chimiques</i>	16
1.2.1. Phénomènes d'adsorption	16
1.2.2. Méthodes de dosage.....	16
1.3. <i>Pharmacocinétique</i>	17
1.3.1. Conventions pour les doses de colistine	17
1.3.2. ADME de la colistine et du CMS après administration systémique	18
1.3.3. Données pharmacocinétiques dans les populations particulières.....	23
1.4. <i>Pharmacodynamie : Activité antibactérienne et mécanisme d'action</i>	24
1.4.1. Spectre d'activité.....	24
1.4.2. Mécanismes d'action de la colistine	24
2. Vieil antibiotique toujours d'actualité : usages et problématiques	26
2.1. <i>Usages en médecine humaine</i>	26
2.1.1. Voie parentérale : indication majoritaire	26
2.1.2. Voie orale : usage minoritaire	28
2.2. <i>Usages en médecine vétérinaire</i>	29
2.2.1. Voie orale : usage majoritaire	29
2.2.2. Autres indications.....	33
2.3. <i>Problèmes de toxicités</i>	34
2.3.1. Néphrotoxicité	34
2.3.2. Neurotoxicité.....	37
2.4. <i>Colistine et antibiorésistance</i>	38
2.4.1. Méthodes de détection des résistances.....	38
2.4.2. Mécanismes de résistances à la colistine.....	39
2.4.3. Prévalence de la résistance à la colistine	45
2.4.4. Impact de la décontamination sélective digestive dans le développement de résistance	48
2.5. <i>Problématiques « One Health » liées à la colistine</i>	50
2.5.1. Transmission et dissémination de mcr-1	50

2.5.2.	Résidus et temps d'attente pour la colistine.....	53
3.	La modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK).....	56
3.1.	<i>Le concept de la modélisation PBPK.....</i>	56
3.2.	<i>Elaboration d'un modèle PBPK.....</i>	57
3.2.1.	Structure du modèle	57
3.2.2.	L'expression mathématique générale (modèle débit limité)	59
3.2.3.	Paramétrisation du modèle et calibration	61
3.2.4.	Résolution numérique des équations	62
3.2.5.	Evaluation du modèle	63
3.3.	<i>Limites des modèles PBPK.....</i>	63
3.4.	<i>Applications de la modélisation PBPK.....</i>	64
3.4.1.	L'extrapolation intra et inter-espèces.....	64
3.4.2.	Estimation des temps d'attente en médecine vétérinaire.....	72
4.	Objectifs de la thèse	74
II.	Partie expérimentale	77
5.	Antibiorésistance et usages de colistine par voie orale.....	78
5.1.	<i>Impact d'un traitement à la colistine chez le porcelet hébergeant un E. coli positif pour mcr-1</i>	78
5.1.1.	Introduction	78
5.1.2.	Etude préliminaire.....	78
5.1.3.	Article publié (étude principale).....	83
5.1.4.	Discussion/ Perspectives	98
5.2.	<i>Traitement à la colistine par voie orale chez le rat hébergeant un microbiote intestinal humain porteur d'un E. coli positif pour mcr-1.....</i>	100
5.2.1.	Introduction	100
5.2.2.	Matériels et méthodes.....	101
5.2.3.	Résultats.....	103
5.2.4.	Discussion/ Perspectives	111
6.	Modélisation PBPK du CMS et de la colistine par voie systémique.....	113
6.1.	<i>Modèle PBPK chez le porc : distribution rénale et application à l'estimation des temps d'attente .</i>	113
6.1.1.	Introduction	113
6.1.2.	Article	113
6.1.3.	Discussion/ Perspectives	161
6.2.	<i>Modélisation PBPK– extrapolation à l'Homme et l'enfant (résultats préliminaires)</i>	163
6.2.1.	Introduction	163
6.2.2.	Matériels et méthodes.....	164
6.2.3.	Résultats.....	178
6.2.4.	Discussion/ Perspectives	189
CONCLUSION.....		194
ANNEXE		201
REFERENCES		206

Liste des publications et communications

Viel, A., Henri J., Bouchène S., Laroche J., Rolland JG., Manceau J., Laurentie M., Couet W., Grégoire. N (2017). A population WB-PBPK model of colistin and its prodrug CMS in pigs: focus on the renal distribution and excretion. Soumis à Pharmaceutical Research.

Viel, A., Henri, J., Perrin-Guyomard, A., Laroche, J., Couet, W., Grégoire, N., Laurentie, M. (2017). Lack of experimental evidence to support mcr-1-positive *Escherichia coli* strain selection during oral administration of colistin at recommended and higher dose given by gavage in weaned piglets. International Journal of Antimicrobial Agents.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.013>

Viel, A., Grégoire, N., Henri J, Couet W., Laurentie M. (2016). The influence of age on colistin methanosulfonate and colistin plasmatic and tissular distribution after intravenous administration of colistin methanosulfonate in pigs. Poster presented at the 9th International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine in Budapest, Hungary.

Viel, A., Henri, J., Perrin-Guyomard, A., Laroche, J., Couet, W., Grégoire, N., Laurentie, M. (2016). Usage de la colistine par voie orale en médecine vétérinaire et humaine : quels effets sur la sélection de *E.coli* résistants à la colistine ? Communication orale à la Journée des Doctorants et Post-doctorants de l'Anses, Paris.

Liste des abréviations

ADME : absorption, distribution, métabolisme, excrétion

AGP : alpha-1-glycoprotéine acide

AMM : autorisation de mise sur le marché

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

BGN : bactérie Gram négatif

BLSE : β -lactamases à spectre étendu

BW : poids

CBA : colistin base activity

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMS : colistiméthate de sodium, colistine méthane sulfonate de sodium

col-R : résistant(ce) à la colistine

CV : coefficient de variation

DFG : débit de filtration glomérulaire

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control - Centre européen de prévention et de contrôle des maladies

ECmcr1+ : souche d'E. coli porteuse de mcr-1

ECTot : population E. coli totale

EFSA : European food safety Authority - Autorité européenne de sécurité des aliments

ELF : epithelial lung fluid – liquid épithélial alvéolaire

EMA : European Medicine Agency - Agence européenne du médicament

FDA : Food and Drug Administration

fm : la fraction de la dose de CMS convertie en colistine

fu : unbound fraction – fraction libre

fu_CMS : fraction libre du CMS

fu_coli : fraction libre de la colistine

HPLC : high pressure liquid chromatography - chromatographie en phase liquide à haute performance

IIV : variabilité inter-individuelle

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IRA : insuffisance rénale aigüe

IV : intra-veineuse

IVIVE : extrapolation in vitro-in vivo

KIM-1 : kidney injury molecule 1

Kp : coefficient de partage

L-Ara4N : 4-amino-4-désoxy-L-arabinose

LC-MS/MS : Liquid chromatography-mass spectrometry - chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LMR : limite maximale de résidu

LOD : limite de détection

LOQ : limite de quantification

LPS : lipopolysaccharide

NLME : non-linéaire à effets mixtes

OCTN : organic cation transporter

PBPK : physiologically-based pharmacokinetics - pharmacocinétique basée sur la physiologie

PCU : Population Correction Unit

PEM : précédemment estimés par le modèle

PEPT : oligopeptide transporter

pEtN : phosphoéthanolamine

PK : pharmacocinétique

pKa : constante d'acidité

PP : polypropylène

PPM : potentially pathogenic microorganisms - micro-organismes potentiellement pathogènes

QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

RV : erreur résiduelle

SDD : selective digestive decontamination - décontamination digestive sélective

SED : système d'équations différentielles

UFC : Unité Formant Colonie

UI : unité internationale

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de la colistine et du CMS.	15
Figure 2 : Diagramme d'élimination du CMS et de la colistine.	20
Figure 3 : Mécanismes impliqués ou (supposément impliqués) dans l'accumulation intracellulaire de colistine dans le rein.	22
Figure 4 : Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane des bactéries Gram négatif.	25
Figure 5 : Consommation de polymyxines par pays de l'Europe en 2015	27
Figure 6: Données de vente des polymyxines pharmaceutiques pour les animaux de production, en mg/PCU, selon la forme pharmaceutique, en Europe pour 2014.....	30
Figure 7: Vente de polymyxines à destination des animaux dans les pays de l'UE, entre 2011 et 2014.....	32
Figure 8 : Principaux mécanismes cellulaires responsables de la néphrotoxicité induite par la colistine (et potentiellement le CMS).....	37
Figure 9 : Mécanismes moléculaires de la résistance à la colistine par modification du lipide A	40
Figure 10 : Diagramme des gènes principaux impliqués dans la résistance à la colistine pour les bactéries Gram négatif.....	41
Figure 11 : Pays dans lesquels le gène mcr-1 a été identifié (2016).....	46
Figure 12 : Différentes voies possibles de dissémination des E. coli porteur de mcr-1 selon le concept "One Health"	53
Figure 13 : Structure d'un modèle whole-body PBPK.	58
Figure 14 : Modèle débit-limité (A) versus modèles à perméabilité-limité avec 2 (B) ou 3 (C) sous-compartiments.	59
Figure 15 : Comparaison des poids des organes principaux entre animaux de laboratoire et l'Homme.	70
Figure 16 : Objectifs de la partie expérimentale de la thèse	76
Figure 17 : Dénombrement fécal des souches de E. coli inoculées (deux tailles d'inoculum pour chaque souche) au cours du temps.	82
Figure 18 : Dénombrement fécal au cours du temps des souches de E. coli inoculées et impact d'un traitement à la colistine.	82
Figure 19 : Evolution de la population totale de E. coli et de la souche ECmcr1+ en fonction du schéma d'inoculation.....	105
Figure 20 : Suivi des ECtot dans les fèces en fonction de la dose de colistine utilisée.....	108
Figure 21 : Cinétique individuelle fécale de la colistine chez les 5 rats après 3 jours de traitement à la dose faible.	109
Figure 22 : Evolution de la population totale E. coli et de la souche ECmcr1+ lors d'un traitement à la colistine.	111
Figure 24 : Etapes et objectifs d'extrapolation du modèle PBPK.....	166
Figure 25 : Coefficients de partage (Kp) pour la colistine déterminés expérimentalement chez les porcelets de différents âges et le porc adulte (pour comparaison).	179

<i>Figure 26 : Prédictions vs observations des concentrations plasmatiques de CMS et colistine dans les différents groupes d'âge après une IV de CMS à 10 mg/kg.....</i>	<i>181</i>
<i>Figure 27 : Prédictions vs observations des concentrations rénales de colistine dans les différents groupes d'âge après une IV de CMS à 10 mg/kg.</i>	<i>182</i>
<i>Figure 28 : Prédictions vs observations des quantités urinaires cumulées de CMS dans les différents groupes d'âge après une IV de CMS à 10 mg/kg.</i>	<i>183</i>
<i>Figure 29 : Concentrations plasmatiques (A) et quantités urinaires (B) prédites à partir du modèle PBPK Homme adulte versus données observées, avec adaptation des paramètres estimés au poids.</i>	<i>185</i>
<i>Figure 30 : Concentrations plasmatiques (A) et quantités urinaires (B) prédites à partir du modèle PBPK Homme adulte versus données observées, avec réestimation des paramètres.</i>	<i>187</i>
<i>Figure 31 : Profil typique de colistine plasmatique chez un enfant de 5 ans en fonction de la dose de CMS.....</i>	<i>188</i>
<i>Figure 32 : Impact d'une variation du DFG sur le profil typique de colistine plasmatique chez un enfant de 5 ans traité avec du CMS.</i>	<i>189</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Fraction libre de la colistine déterminée chez diverses espèces animales et l'Homme.</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 2 : Données de LMR pour la colistine.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 3 : Etudes expérimentales utilisées pour développer le modèle PBPK porcin juvénile et le modèle PBPK homme adulte.</i>	<i>168</i>
<i>Tableau 4 : Valeurs des paramètres physiologiques implémentés dans le modèle porcin juvénile</i>	<i>171</i>
<i>Tableau 5 : Valeurs des paramètres PEM adaptés au modèle PBPK porcin juvénile</i>	<i>172</i>
<i>Tableau 6 : Valeurs des paramètres pour le modèle PBPK Homme adulte.</i>	<i>174</i>
<i>Tableau 7 : Résultats de la détermination de la fraction libre de CMS dans le plasma humain</i>	<i>184</i>
<i>Tableau 8 : Valeurs des paramètres PEM réestimés pour le modèle PBPK Homme adulte et comparaison avec l'approche allométrique.</i>	<i>186</i>

Liste des Annexes

<i>Figure S1: Quantification des populations bactériennes cultivable du microbiote intestinal du donneur</i>	<i>205</i>
<i>Tableau S1 : Paramètres PK du CMS et de la colistine chez diverses espèces animales et l'Homme.....</i>	<i>201</i>
<i>Tableau S2 : Milieux utilisés pour le dénombrement des populations bactériennes.....</i>	<i>205</i>

INTRODUCTION

L'antibiorésistance, qui définit l'aptitude des bactéries à résister à l'action d'un (ou des) antibiotique(s), est un sujet de Santé Publique international majeur. L'évolution et la diffusion des résistances aux antibiotiques, notamment pour des bactéries pathogènes a provoqué des difficultés thérapeutiques pour certaines infections chez l'Homme. Par ailleurs, ce phénomène ne touche pas seulement les populations humaines mais également les animaux et l'environnement. Ainsi, le concept « One Health », qui met en avant la nécessité d'une approche intégrée et collaborative des problématiques de santé à l'interface entre Homme, animal et environnement, doit s'appliquer à la gestion de ce phénomène.

L'augmentation globale de la résistance s'accompagne en outre d'une diminution de la découverte de nouvelles molécules antibiotiques depuis deux décennies, pourtant nécessaires pour pallier ce problème. La crainte principale est l'arrivée d'une nouvelle ère dans laquelle l'arsenal thérapeutique contre les infections deviendrait très limité, voire inexistant.

En l'absence de nouveau traitement disponible, une alternative réside dans l'utilisation de molécules antibiotiques anciennes dont l'usage avait été abandonné. La colistine figure parmi ces molécules qui ont été réintroduites dans l'arsenal thérapeutique. Cet antibiotique polypeptidique de la famille des polymyxines a été découvert en 1950 par Y. Koyama à partir de cultures de *Bacillus colistinus* (Suzuki et al., 1963), mais a été délaissé en médecine humaine à partir des années 1970 en raison de problème de toxicité (Bergen et al., 2012). Depuis environ une décennie, la colistine redevient ainsi un traitement d'actualité pour lutter contre certaines bactéries multi-résistantes en milieu hospitalier et est maintenant considéré comme un antibiotique de dernier recours. Le manque flagrant d'informations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques à propos de cette molécule ancienne a nécessité la réalisation de nouvelles études, en lien avec les progrès des méthodes analytiques. Il s'agit d'un axe de recherche toujours important actuellement car tous les aspects n'ont pas encore été complètement explorés.

Parallèlement, la colistine est toujours restée un antibiotique largement utilisé chez les animaux de production en médecine vétérinaire et ceci depuis des décennies. Du fait du retour de la colistine en médecine humaine comme traitement de dernière intention, des questions se sont posées à propos de l'impact de son usage massif chez les animaux sur le développement de résistance pour cette molécule.

Suivant le concept « One Health », optimiser l'usage de la colistine et prévenir le développement de résistance à son encontre, est un axe de recherche qui se doit d'intégrer les problématiques touchant la médecine humaine mais également la médecine vétérinaire. Cette thèse s'inscrit dans ce contexte.

La première partie de ce travail est une synthèse bibliographique sur la colistine et ses usages à la fois en médecine humaine et vétérinaire, suivie d'une présentation du type de modèle pharmacocinétique qui a été utilisé dans la partie expérimentale. La deuxième partie décrit et discute les expérimentations qui ont été menées, d'une part, pour évaluer certaines pratiques d'usage de la colistine en médecine humaine (décontamination digestive sélective) et vétérinaire (usage en production porcine) dans un contexte d'antibiorésistance et, d'autre part, pour explorer la pharmacocinétique de cette molécule grâce à un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie (PBPK) et appliquer ce modèle dans un objectif vétérinaire (estimation des temps d'attente) et de médecine humaine (optimisation de posologie chez l'enfant). Une conclusion générale ainsi que des perspectives de travail sur ce sujet sont finalement proposées.

I. Première partie :

Synthèse bibliographique

La colistine est fréquemment utilisée sous forme de pro-drogue (en médecine humaine), **le colistine méthanesulfonate (CMS)**. Leur structure diffère par la **présence de cinq groupements méthanesulphonés** pour le CMS, qui sont liés aux groupements amine de la molécule de colistine (Figure 1). Contrairement à la colistine, **le CMS est peu stable** en milieu aqueux et **s'hydrolyse progressivement** pour former divers composés intermédiaires (variation du nombre et de la localisation de ces groupes méthanesulphonés), dont finalement la colistine (Li et al., 2003b). Ainsi, le CMS est considéré comme un **mélange de l'ensemble des composés dérivés**, dont le CMS A et le CMS B sont les représentants principaux. Le poids moléculaire du CMS (environ 1632 g/mol) est plus important que celui de la colistine (environ 1167 g/mol), en raison de ces groupements supplémentaires. Le CMS est un polyanion à des valeurs de pH physiologique (Li et al., 2006). Le CMS est plus hydrophile que la colistine et est supposé moins basique mais aucune valeur de pKa n'est référencée (Gregoire et al., 2017).

La formation de colistine à partir de CMS injecté par voie parentérale a été démontrée in vivo chez l'homme (Li et al., 2005b) et le rat (Li et al., 2004).

1.2. Propriétés chimiques

1.2.1. Phénomènes d'adsorption

La **colistine possède la propriété de former des liaisons non-spécifiques avec le matériel de laboratoire**. Pour des concentrations allant de 0,125 à 8 mg/L, cette adsorption a été démontrée pour divers matériaux (verre, polypropylène (PP) et PP modifié pour diminuer les liaisons protéiques, polystyrène) (Karvanen et al., 2017). Cette adsorption est significative (plus de 95 % pour les faibles concentrations dans du polystyrène) et ne peut être ignorée lors des dosages analytiques (cf. 1.2.2) (Gobin et al., 2010; Jansson et al., 2009) ou les expérimentations in vitro (cinétique de bactéricide par exemple) (Gregoire et al., 2017).

1.2.2. Méthodes de dosage

Les données pharmacocinétiques concernant la colistine (et le CMS) obtenues durant le XXe siècle l'ont été exclusivement par des techniques basées sur des mesures de l'effet antibactérien (Evans et al., 1999) ; mais ces méthodes se sont avérées laborieuses, peu spécifiques et non adaptées au dosage du CMS en raison de son instabilité entraînant sa conversion en

colistine. Ces données pharmacocinétiques « anciennes » sont donc à interpréter avec précaution. Il est dorénavant considéré que cette technique de dosage doit être abandonnée (Li et al., 2006) due à la **généralisation de méthodes plus spécifiques et performantes** telles que la chromatographie en phase liquide à haute performance (**HPLC**) et/ou la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (**LC-MS/MS**). Ainsi, depuis le début des années 2000, on observe un essor de ces méthodes de dosage dans les biofluides (urine, plasma) permettant une détermination des concentrations en CMS et en colistine (Gobin et al., 2010; Jansson et al., 2009; Li et al., 2001a; Li et al., 2002).

La détermination de la concentration en colistine se fait le plus souvent en additionnant les surfaces de pics des 2 constituants majoritaires, colistine A et B (Gregoire et al., 2017). **Le dosage du CMS se fait par contre de façon indirecte** : en effet, pour un échantillon contenant du CMS, la concentration en colistine est déterminée avant puis après hydrolyse forcée (du CMS) en milieu acide. En soustrayant la concentration de colistine avant hydrolyse à la concentration obtenue après, on détermine ainsi la concentration en CMS de l'échantillon (Gobin et al., 2010). Ainsi, la concentration en CMS reflète en fait la concentration de tous les dérivés partiels sulfométhylés qu'il n'est pas possible de distinguer (Li et al., 2004). En outre, les matrices (autres que le plasma) sont supplémentées avec du plasma témoin afin de limiter l'adsorption non-spécifique de la colistine aux matériels de laboratoire (cf. supra) (Gobin et al., 2010; Jansson et al., 2009),

1.3. Pharmacocinétique

1.3.1. Conventions pour les doses de colistine

Plusieurs unités sont reconnues pour exprimer les doses de CMS à travers le monde : en Unité internationale (UI), en mg de CMS ou bien en colistin base activity (CBA). **Un million d'UI de CMS correspond à environ 80 mg de CMS ou bien 30 mg de CBA**. Cette dualité d'expression utilisant les « mg » peut aboutir à des confusions entraînant des surdosages de CMS (Nation et al., 2014a).

1.3.2. ADME de la colistine et du CMS après administration systémique

La colistine n'étant que très peu ou pas absorbée au niveau du tube digestif, la voie orale n'est jamais utilisée pour traiter des infections systémiques. Ainsi, seules les études faisant intervenir une administration parentérale seront incluses dans ce chapitre. Cependant, la voie orale est utilisée pour d'autres indications à la fois en médecine humaine (cf. 2.1.2) et vétérinaire (cf. 2.2.1).

1.3.2.1. Distribution

Le CMS et la colistine sont des molécules avec un poids moléculaire important et qui sont sous formes ionisées pour des valeurs de pH physiologiques. **Le passage des membranes cellulaires est donc limité** et la **distribution** de ces deux composés est plutôt circonscrite à **l'espace extracellulaire**, comme le souligne les valeurs de volumes de distribution et de volumes à l'état d'équilibre dans les différentes espèces animales et l'Homme (Tableau S1 en Annexe). Seule la souris présente un volume de distribution plus important que les autres espèces.

Concernant les fractions libres plasmatiques de colistine (fu_coli), les valeurs retrouvées chez l'Homme et différentes espèces animales de laboratoire sont détaillées dans le Tableau 1. Les valeurs retrouvées sont plutôt homogènes entre les différentes espèces sauf chez la souris où la liaison aux protéines plasmatiques est très élevée (~92%). **L'alpha-1-glycoprotéine acide (AGP) est impliquée dans la liaison protéique** avec la colistine, au moins chez l'Homme (Azad et al., 2012) tandis qu'aucune liaison aux autres protéines plasmatiques n'a été reportée. Une attraction électrostatique ainsi que les propriétés lipophiles de la colistine avec des ligands de l'AGP sont à l'origine de cette liaison. En outre, la liaison protéique semble plus importante pour la colistine A, probablement dû au fait que cette dernière possède une plus grande chaîne d'acides gras que la colistine B (Gregoire et al., 2017). Cependant, cette affinité pour l'AGP semble modérée comparée à celle pour le LPS (Soon et al., 2011) ; la colistine pourrait donc facilement ne plus être séquestrée par l'AGP et se lier à la membrane des BGN (Azad et al., 2012). Il existe des différences qualitatives d'AGP entre les espèces animales qui peuvent justifier des cinétiques de liaisons différentes à ces protéines (Son et al., 1998); ainsi, il faut rester prudent quant à l'extrapolation aux animaux de la force de liaison de la colistine à l'AGP de l'Homme.

Concernant la fu du CMS, aucune donnée n'est disponible à ce jour.

Différentes méthodes sont utilisées pour déterminer la fu :

- *la dialyse à l'équilibre*, basée sur la diffusion de la fraction libre à travers une membrane semi-perméable qui ne laisse passer que la molécule d'intérêt mais pas les protéines (temps long pour atteindre l'équilibre).

- *l'ultra-filtration*, pour laquelle la fraction libre de la molécule est récupérée après passage à travers une membrane semi-perméable grâce à la force centrifuge (plus rapide).

- *l'ultra-centrifugation*, qui après centrifugation à grande vitesse, permet d'accumuler les protéines et la forme liée de la molécule dans le culot et d'obtenir un surnageant contenant la forme libre.

Lors de ces expérimentations, les matériaux choisis (pour les contenants) sont primordiaux en raison des liaisons non spécifiques de la colistine au matériel (cf. 1.2.1)

Tableau 1 : Fraction libre de la colistine déterminée chez diverses espèces animales et l'Homme.

Espèce	Fraction libre	Méthode	Référence
Rat	Colistine A : 35 %	Dialyse à l'équilibre	(Li et al., 2003c)
	Colistine B : 52 %		
	Colistine A : 44 %	Ultra-centrifugation	(Sivanesan et al., 2017)
	Colistine B : 58 %		
Souris (neutropéniques)	Colistine : 8,4 %	Dialyse à l'équilibre et ultra-centrifugation	(Cheah et al., 2015)
Porc	Colistine : 39 %	Ultra-filtration	(Rottbøll and Friis, 2016)
Homme (volontaires sains)	Colistine A : relation non linéaire avec la concentration (16 % à 0,1 mg/L ; 31 % à 10 mg/L)	Dialyse à l'équilibre	(Mohamed et al., 2012)
	Colistine B : 43 %		
Homme (patients de réanimation)	Colistine : 34 %		

1.3.2.2. Clairance et métabolisme

Les premières études pharmacocinétiques basées sur l'HPLC comme méthode de dosage ont montré que chez le rat traité avec du sulfate de colistine par voie IV, la quantité de colistine éliminée dans les urines était très faible (moins de 0,5 % de la dose initiale) (Li et al., 2003c). Inversement, une forte clairance rénale du CMS a été observée avec environ 60 % de la dose initiale présente dans les urines après injection IV de CMS (Li et al., 2004). La colistine retrouvée dans les urines en quantité importante serait due à l'hydrolyse du CMS au niveau des voies urinaires après excrétion rénale de CMS, ce qui complique l'estimation des paramètres de clairance. Ce profil d'élimination a également été confirmé chez le volontaire sain (Couet et al., 2011) avec environ 70 % et 1 % de la dose de CMS administrée retrouvée dans les urines pour le CMS et la colistine, respectivement. Ainsi, **la clairance de la colistine est donc essentiellement non-rénale contrairement au CMS qui, lui, est majoritairement excrété par voie urinaire sous forme inchangée (mais subit une hydrolyse post-excrétion)** (Figure 2).

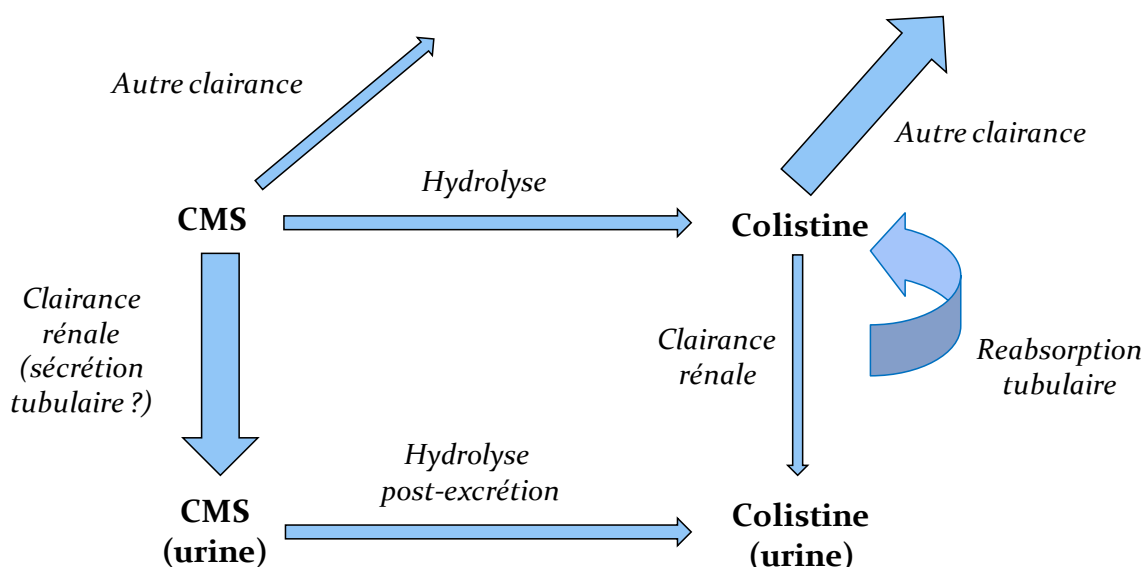


Figure 2 : Diagramme d'élimination du CMS et de la colistine.

L'épaisseur des flèches reflète l'importance de chaque processus.

L'élimination du CMS a lieu par **filtration glomérulaire** ainsi que **potentiellement via une sécrétion tubulaire**. En effet, chez le rat la clairance rénale de CMS (7,2 mL/min/kg) est apparue comme étant supérieure au débit de filtration glomérulaire (DFG) de cette espèce (~5,2 mL/min/kg) (Li et al., 2004). Même en admettant une valeur de 100 % de fu_{CMS} (alors qu'inconnue), la clairance de filtration rénale, définie par le produit de la fu_{CMS} par le DFG, serait

inférieure à la clairance rénale totale estimée. Chez le volontaire sain, la clairance rénale de CMS (~100 mL/min) est proche de celle du DFG (~120 mL/min) (Couet et al., 2011). De la même façon, cette éventuelle sécrétion tubulaire ne peut être estimée, ni exclue en raison de l'ignorance de la f_{u_CMS} .

Le CMS non éliminé dans les urines est donc hydrolysé en colistine dans l'organisme. Cependant, la fraction de la dose de CMS convertie en colistine (notée f_m) est faible chez le rat (entre 6,8 et 12,5 %, voir Tableau S1 en Annexe) ce qui met en avant qu'une fraction non négligeable de CMS (~33 % chez le rat d'après (Li et al., 2004)) est éliminée selon d'autres mécanismes encore inconnus (ni éliminée par le rein, ni hydrolysée en colistine). Chez le volontaire sain, en considérant que toute la fraction du CMS non-éliminée dans les urines est convertie en colistine, la f_m a été estimée à 30 % (Couet et al., 2011). Dans l'ensemble, il est estimé que chez l'Homme avec une fonction rénale normale, seule 20 à 25 % d'une dose de CMS serait finalement convertie en colistine, soulignant **le fait que le CMS est une pro-drogue avec un « rendement » limité** (Nation et al., 2014b). En outre, la conversion du CMS en colistine semble assez variable entre individus (Garonzik et al., 2011), probablement en raison de la complexité des différentes voies impliquées dans l'élimination du CMS (Figure 2) (Nation et al., 2014b). Cette variabilité pourrait également dépendre du lot de CMS utilisé. En effet, une étude chez le rat portant sur la PK plasmatiques de différentes spécialités de CMS injectables (4 marques différentes) a révélé que la fraction convertie in vivo en colistine peut varier de façon significative entre les lots, et ce malgré une composition élémentaire similaire entre les différentes poudres (He et al., 2013).

Concernant la colistine, la faible clairance rénale a été expliquée de façon mécanistique. En effet, une étude sur le rein de rat isolé perfusé avec de la colistine a montré que moins de 10% de la quantité de colistine éliminée du perfusat était retrouvé dans les urines, démontrant **la réabsorption tubulaire très importante de la colistine** (Ma et al., 2009). En outre, des transporteurs rénaux exprimés au niveau des cellules tubulaires proximales ont été suspectés dans ce processus, dont l'organopeptide transporter 2 (PEPT2) et un organic cation transporter (OCTN1) (Ma et al., 2009) (Figure 3). L'implication de PEPT2 dans la réabsorption tubulaire des polymyxines en général a été confirmée sur des lignées cellulaires humaines, mais pas celle d'OCTN1 (Lu et al., 2015). Très récemment, le transporteur OCTN2 a également été identifié comme participant au transport de colistine depuis la lumière tubulaire sur des cultures in vitro

de cellules rénales humaines et murines (Visentin et al., 2017). En outre, une accumulation dans les cellules tubulaires proximales par l'intermédiaire de la mégaline a également été démontrée chez le rat pour la colistine (Suzuki et al., 2013). Cette protéine, abondamment exprimée à la surface de ces cellules du côté apical, possède un rôle de récepteur d'endocytose (Christensen et al., 2009). En accord avec l'implication de transporteurs actifs, la réabsorption s'est avérée être saturable (Abdelraouf et al., 2014; Lu et al., 2015).

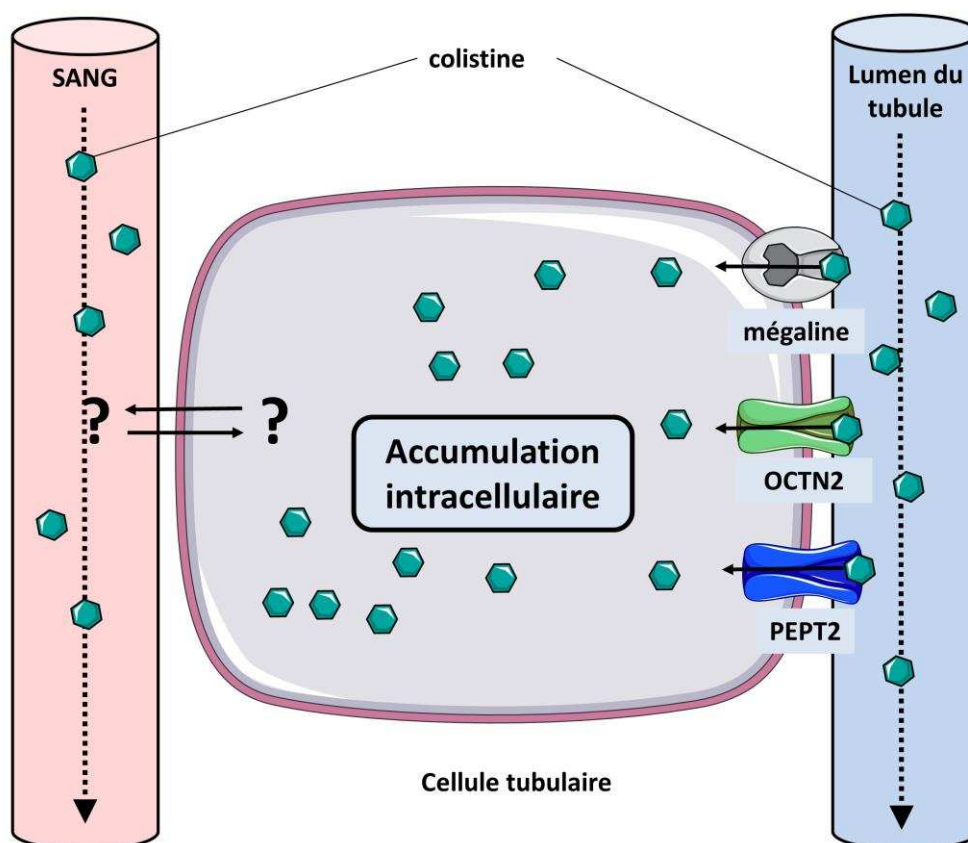


Figure 3 : Mécanismes impliqués ou (supposément impliqués) dans l'accumulation intracellulaire de colistine dans le rein.

Après avoir été réabsorbées, **les polymyxines tendent à s'accumuler dans le rein**. Cette accumulation se fait dans le cortex rénal, essentiellement au niveau des cellules tubulaires proximales (Yun et al., 2015; Yun et al., 2014). Sur des lignées de cellules tubulaires humaines et murines, la concentration intracellulaire de colistine a été mesurée à des taux 2000 à 4000 fois supérieurs que la concentration extracellulaire (Azad et al., 2015b). In vivo, il a été observé un ratio d'environ 65 entre les concentrations rénales et plasmatiques de colistine chez des rats sacrifiés après 7 jours de traitement à la colistine (dose cumulée de 36,5 mg/kg) (Yousef et al., 2011). Ce phénomène observé est **en lien avec la néphrotoxicité** des polymyxines (cf. 2.3.1).

Les **voies d'élimination de la colistine sont donc principalement non-rénales**. Une élimination biliaire a été évoquée d'après une ancienne étude chez le lapin mais ne semble pas être le mécanisme principal (Abe et al., 1976). Comme la colistine est un peptide, une hydrolyse enzymatique pourrait être à l'origine de son élimination. Des essais in vitro de vitesse de dégradation de la colistine dans des homogénats d'organes (foie, rein, muscles...) et de plasma à 37°C n'ont pas montré de différences significatives (Bouchene, 2013), ce qui semble en faveur d'un mécanisme ubiquitaire entre les organes.

1.3.3. Données pharmacocinétiques dans les populations particulières

De nombreuses études PK du CMS et de la colistine ont été réalisées chez le patients de réanimation et le volontaire sain (une synthèse est présentée dans le Tableau S1 en Annexe). Cependant, les données PK dans les populations pédiatriques sont rares. Plusieurs études se sont intéressées à l'efficacité des traitements à la colistine chez le nouveau-né et l'enfant, mais une seule a présenté une analyse PK chez 7 nourrissons atteints de pneumonie et/ou septicémie (Nakwan et al., 2016). Les auteurs ont montré qu'après une IV unique de 150 000 UI/kg de CMS, la concentration plasmatique de colistine était sub-thérapeutique ($< 2 \mu\text{g/mL}$) 6h après la fin de l'administration. En outre, la concentration plasmatique à l'équilibre en colistine était également trop faible ($1,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$). La demi-vie de la colistine (environ 9h) est dans l'intervalle de celles retrouvées chez le patient adulte de réanimation (cf. Tableau S1). Cependant, comme il s'agit de paramètres PK apparents et que la fraction de CMS convertie en colistine n'a pas été estimée, ces différences de valeurs entre le nouveau-né et l'adulte sont délicates à comparer. Globalement, en raison du faible nombre de données PK disponibles chez les populations pédiatriques, **l'adaptation de la(les) posologie(s) dans cette sous-population reste à optimiser.**

1.4. Pharmacodynamie : Activité antibactérienne et mécanisme d'action

1.4.1. Spectre d'activité

La colistine est une **molécule bactéricide, à spectre étroit, dirigée contre une majorité de bactéries Gram négatif (BGN)**. Ainsi les espèces classiques d'Enterobacteriaceae, Acitenobacter, P. aeruginosa et Aeromonas y sont naturellement sensibles. Les bactéries gram positif usuellement trouvées en pratique clinique sont naturellement résistantes, ainsi que les bactéries anaérobies et les mycoplasmes (Li et al., 2005a). In vitro la colistine a un effet bactéricide très rapide et se comporte comme un antibiotique concentration-dépendant avec les souches de P. aeruginosa (Li et al., 2001b; Peterson et al., 1985).

1.4.2. Mécanismes d'action de la colistine

Les mécanismes d'action de la colistine sont considérés comme quasi-semblables à ceux de la polymyxine B car leur structure ne diffère que par un seul acide aminé. Cette dernière ayant été plus étudiée, elle fait figure de modèle d'étude pour l'ensemble des polymyxines (Nation et al., 2014b).

La cible principale des polymyxines est le lipopolysaccharide (LPS) des membranes des BGN, ce **qui aboutit à la lyse bactérienne** selon plusieurs étapes (Figure 4) :

- (i) Le lipide A de la partie externe du LPS est chargé négativement et interagit avec certains cations divalents (calcium et magnésium essentiellement) permettant une stabilisation globale de la membrane externe. La colistine, possédant une charge globale positive, a donc une affinité forte avec le LPS pour s'y lier.
- (ii) Cette liaison entraîne un déplacement des cations par interaction électrostatique (Dixon and Chopra, 1986) ce qui provoque une désorganisation de la structure membranaire avec libération du LPS.
- (iii) La colistine s'insère ensuite dans la membrane externe grâce à sa chaîne d'acide-gras lipophiles (Velkov et al., 2009).

- (iv) La colistine entraîne une altération de la perméabilité de cette membrane externe (Peterson et al., 1985) lui permettant à la colistine de s'insérer et d'atteindre la membrane interne.
- (v) Une désorganisation de cette membrane interne se produit alors par rupture de l'intégrité de la bi-couche de phospholipides (Velkov et al., 2009).
- (vi) Au final, la lyse de cette membrane entraîne le relargage du contenu intracellulaire et la mort de la bactérie (Lim et al., 2010; Velkov et al., 2009).

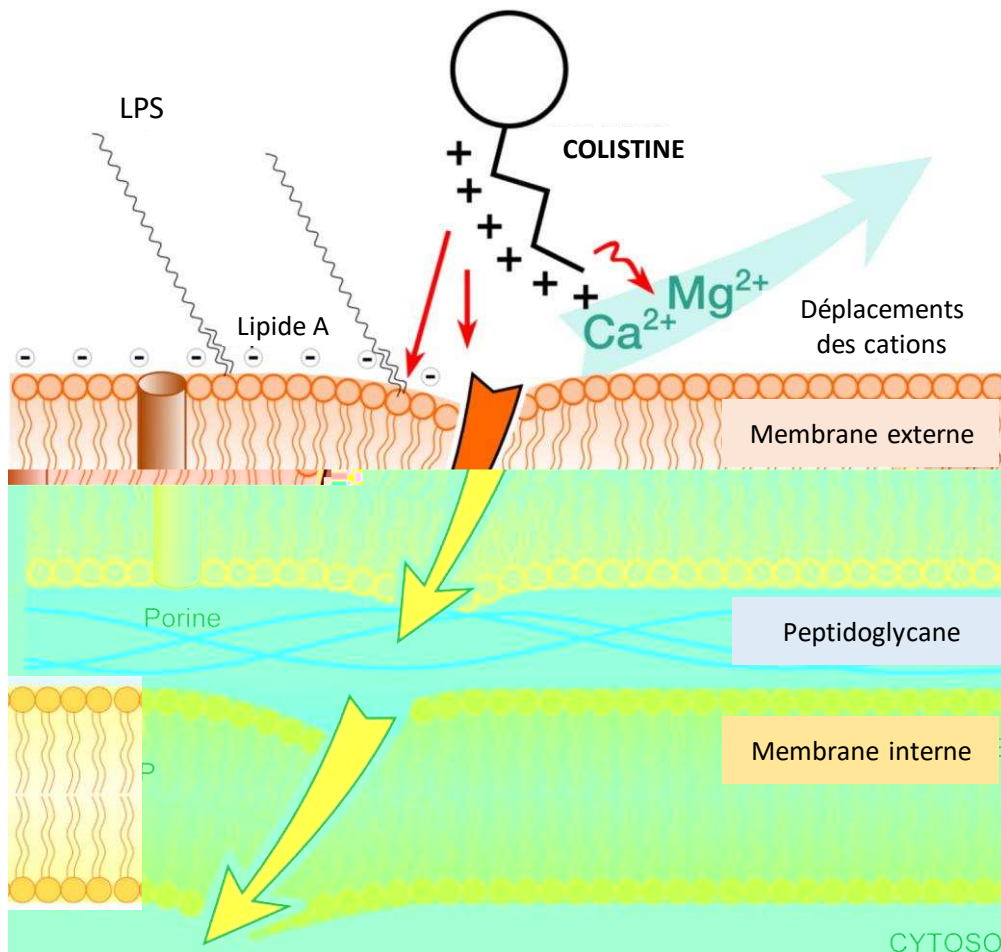


Figure 4 : Mécanisme d'action de la colistine sur la membrane des bactéries Gram négatif.

LPS : lipopolysaccharide. Adapté de (Martis et al., 2014)

Ce processus est le plus communément admis pour expliquer l'action antibactérienne de la colistine mais les mécanismes ultimes aboutissant à la mort cellulaire sont encore assez peu connus (Nation et al., 2014b).

D'autres mécanismes possibles ont été identifiés. Le « vesicle-vesicle contact » est lié à des échanges lipidiques entre membrane interne et externe après franchissement de la membrane externe des bactéries par une polymyxine. Ceci provoque des modifications structurales

des membranes, avec comme conséquence un déséquilibre osmotique qui lyse la bactérie (Cajal et al., 1996; Clausell et al., 2007). Cependant, ceci n'a été observé que pour la polymyxine B.

Enfin, l'accumulation de radicaux libres liée à l'induction d'un stress oxydatif par les polymyxines est une voie d'action récemment découverte. Ces radicaux libres vont par la suite être responsables de dommages au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides aboutissant à la mort bactérienne (Sampson et al., 2012).

Contrairement à la colistine, la structure du CMS ne lui confère pas ou peu de charge positive. En conséquence, **le CMS n'a pas ou très peu d'activité antibactérienne** par lui-même et est considéré de ce point de vue comme une pro-drogue inactive (Bergen et al., 2006).

2. Vieil antibiotique toujours d'actualité : usages et problématiques

2.1. Usages en médecine humaine

2.1.1. Voie parentérale : indication majoritaire

La colistine a été utilisée par voie systémique et/ou par nébulisation de façon assez minoritaire pendant des décennies en raison de problèmes de toxicité (cf. 2.3). Seuls les patients atteints de mucoviscidose étaient traités par cet antibiotique pour contrôler les complications infectieuses (Beringer, 2001).

Depuis une dizaine d'années, **le regain d'intérêt de l'utilisation de la colistine** est lié à l'augmentation des infections nosocomiales dues à des **BGN multi-résistantes**, notamment *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et *K. pneumoniae* (Li et al., 2005a; Li et al., 2006). Cet antibiotique est maintenant considéré comme une molécule de choix en dernier recours et est majoritairement utilisé sous forme de CMS par voie IV pour combattre les infections dues à des BGN résistantes aux carbapénèmes, comme *K. pneumoniae* par exemple (Petrosillo et al., 2013); mais aussi sous forme d'inhalation pour traiter les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (ou par des patients atteints de mucoviscidose), qui sont dues à *P. aeruginosa* ou *A. baumannii* multi-résistantes (Lu et al., 2013). Une méta-analyse récente a souligné l'intérêt et l'efficacité

de cette voie nébulisée pour combattre ces infections respiratoires, en plus d'une toxicité probablement moindre que par voie IV (Vardakas et al., 2017). Cependant, d'autres études sont encore nécessaires pour confirmer ces résultats. En outre, l'association de la colistine avec d'autres antibiotiques tels que la tigécycline ou des carbapénèmes s'avère nécessaire et efficace pour combattre certaines entérobactéries productrices de carbapénémases (Tumbarello et al., 2012).

Les infections par *A. baumannii* multi-résistantes sont un réel problème dans les unités de soins intensifs néonatales (Folgori et al., 2017). Ainsi, **la colistine est également utilisée chez l'enfant** pour lutter contre les infections dues à des BGN multi-résistantes. L'efficacité semble être prouvée avec un intervalle allant de 72 à 98 % de patients guéris selon les études (Falagas et al., 2009b; Tekgunduz et al., 2015), même si les comparaisons sont délicates car les posologies utilisées sont variées. Une récente étude sur 94 enfants a montré que l'efficacité des traitements à la colistine n'était pas moindre que pour ceux sans colistine, dans un contexte d'infections à BGN multi-résistantes (Ozsurekci et al., 2016).

Ainsi, entre 2010 et 2014, **la consommation hospitalière totale de colistine en Europe a augmenté d'environ 50%** en lien avec l'augmentation de BGN pathogènes multi-résistantes (EMA, 2016d). Cependant, les tendances de consommation des polymyxines (colistine en majorité) de chaque pays de l'UE sont assez variées (Figure 5).

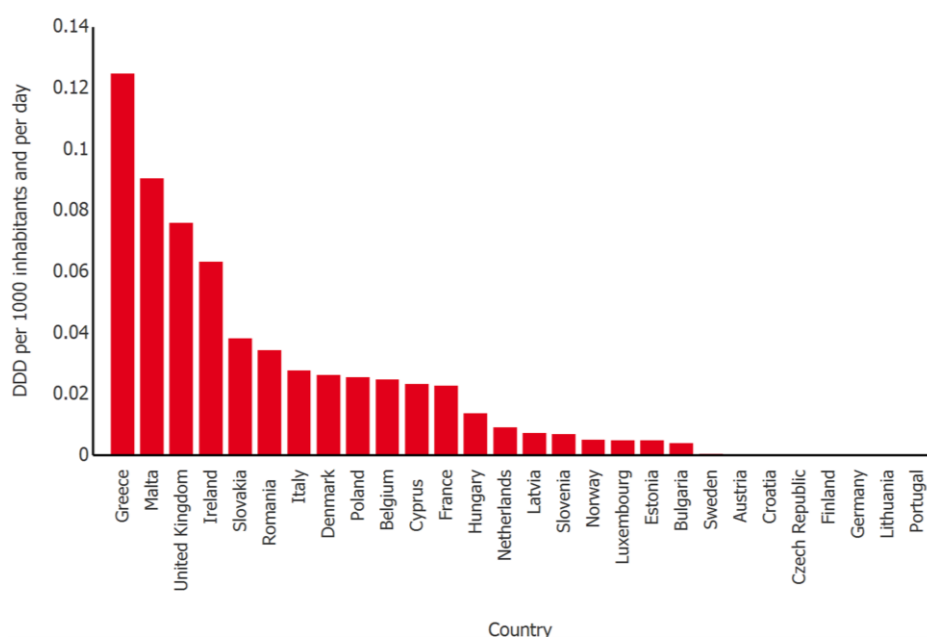


Figure 5 : Consommation de polymyxines par pays de l'Europe en 2015

DDD : defined daily dose (dose définie quotidienne). D'après (ECDC, 2016c).

2.1.2. Voie orale : usage minoritaire

De façon assez minoritaire, la colistine peut être utilisée par voie orale pour le traitement des diarrhées d'origine bactérienne chez l'enfant, ainsi qu'en topique pour des infections oculaires et/ou auriculaires à *P. aeruginosa*.

Un autre usage, assez controversé, concerne l'utilisation de cette molécule à **visée de décontamination sélective du tractus digestif (SDD)**. Le but de ce **traitement prophylactique** est de prévenir les infections endogènes des voies respiratoires et du sang, et globalement réduire la mortalité chez les patients de soins intensifs (Bonten, 2006; Silvestri et al., 2012). Ces infections proviennent principalement d'un déséquilibre du microbiote des patients malades, provoquant le (sur)développement de bactéries composant la flore « normale » tel *E. coli*, ou de bactéries pathogènes représentant une flore « anormale », comme les *Klebsiell*es (Silvestri et al., 2012). Le tube digestif est l'endroit principal à l'origine de ces proliférations bactériennes, qui peuvent par la suite coloniser et infecter d'autres organes.

Le **principe de la SDD** repose sur **l'usage d'une combinaison d'antibiotiques** (et d'antifongiques) administrés au niveau de l'oropharynx pour la décontamination sélective oropharyngée et **par voie orale** pour la SDD (via une sonde naso-gastrique le plus souvent). Les molécules classiquement utilisées sont la colistine, la tobramycine et l'amphotéricine B. Elles ont comme avantage de ne pas passer (ou de façon infime) la barrière digestive et donc de provoquer de **fortes concentrations locales**, jusque 100 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) des bactéries sensibles dans la salive, les fluides digestifs et les fèces (van der Voort and van Saene, 2008). En outre, il est fréquemment associé à ce traitement per os, l'administration d'un antibiotique par voie parentérale à l'admission : il s'agit d'une céphalosporine de 3^e génération le plus souvent, en raison de son spectre large et sa bonne diffusion vers la salive et la bile (Silvestri et al., 2012). Ce premier traitement dure entre 3 et 5 jours et doit s'achever lorsque les prélèvements pour analyses microbiologiques sont tous négatifs.

La SDD a été décrite comme « sélective » car il a longtemps été affirmé que ces antibiotiques tuaient les bactéries aérobies tout en préservant la flore intestinale anaérobie (van der Voort and van Saene, 2008) qui pouvait alors servir de « barrière naturelle » contre la colonisation et l'infection par les bactéries gram négatif (de Jonge et al., 2003). Il apparaît finalement

que le mécanisme principal est l'obtention de fortes concentrations locales en antibiotiques actifs contre la surpopulation de la flore « normale » et « anormale » (Silvestri et al., 2012).

La population cible de la SDD comprend usuellement les patients sous ventilation mécanique depuis au moins 48 h (pour éviter les pneumonies acquises sous ventilation) et/ou les patients restants plus de 3 jours en soins intensifs (van der Voort and van Saene, 2008). Ce type de prophylaxie a également été utilisée lors d'épidémies de bactéries multi-résistantes (nosocomiales) afin d'enrayer la transmission entre patients (Brun-Buisson et al.; Oostdijk et al., 2012).

L'utilisation de la colistine dans un objectif de décontamination digestive en milieu hospitalier remonte au début des années 1980 (van der Voort and van Saene, 2008). Actuellement, il est difficile de dire à quel point cet usage est répandu mais il est souligné que seule une minorité d'unités de soins intensifs en Europe y ont recours (Kesecioglu and Eggimann, 2016). Par exemple, un sondage réalisé en 2009 au Royaume-Uni a déterminé qu'environ 5 % (10/193) des unités de soins intensifs britanniques (ayant répondu) avaient recours à cette pratique (Bastin and Ryanna, 2009) et le même taux a été retrouvé en 2014 dans ce pays (5,2 % soit 13/250 unités) (Canter et al., 2014).

2.2. Usages en médecine vétérinaire

2.2.1. Voie orale : usage majoritaire

La colistine, sous forme de sulfate par voie orale, est la forme très majoritairement utilisée en médecine vétérinaire et **essentiellement à destination des animaux de production** en UE. Il s'agit d'un antibiotique principalement utile en **médecine de population**, pour **combattre les maladies digestives infectieuses** dues à des BGN (Enterobacteriaceae majoritairement). La colistine est disponible sous différentes formulations (pré-mélanges médicamenteux, poudre, solution buvable) (Figure 6) et la grosse majorité des traitements est administrée via l'aliment ou l'eau de boisson (EMA, 2016d). En 2014, la famille des polymyxines était le 5^e antibiotique le plus vendu en Europe, comptant pour environ 7% de tous les antibiotiques. Parmi les polymyxines, la colistine représentait plus de 99,9% des ventes (EMA, 2016d).

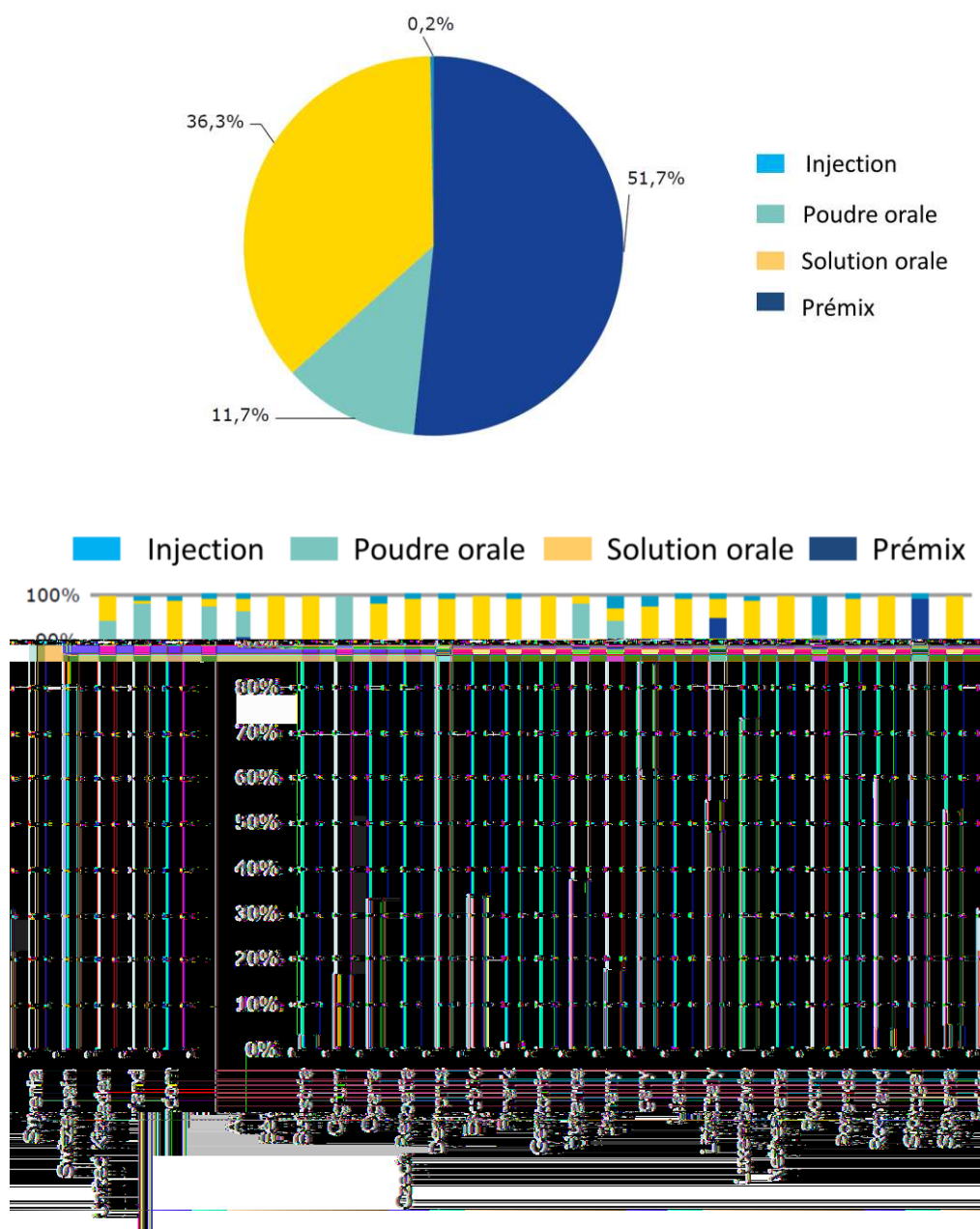


Figure 6: Données de vente des polymyxines pharmaceutiques pour les animaux de production, en mg/PCU, selon la forme pharmaceutique, en Europe pour 2014

En haut, les résultats globaux pour l'Europe ; en bas, le détail par pays.(EMA, 2016c).

PCU : « Population Correction Unit » qui tient compte de la population animale ainsi que du poids estimé de chaque animal au moment du traitement antibiotique

La filière porcine figure parmi les gros utilisateurs de colistine en Europe et cet antibiotique représenterait plus de 30 % des usages d'antibiotiques dans cette filière (EMA, 2016d). En France, on estime qu'environ un-tiers de l'exposition totale des porcs aux antibiotiques est due à la famille des polypeptides (majoritairement la colistine) (Kempf et al., 2013). Les traitements se font le plus souvent au moment du sevrage ou en post-sevrage afin d'enrayer

les infections digestives due à *E. coli* qui surviennent suite aux perturbations du microbiote intestinal liées au changement d'alimentation. Ainsi, une étude menée en 2008 sur 83 élevages de porcs français a montré que 90 % d'entre eux avait recours à la colistine en post-sevrage (Chauvin, 2010). Une diminution de cette proportion est notée dans ce type de production entre 2010 et 2013 mais avec toujours plus de 80 % des élevages concernés (Hémonic et al., 2016).

La dose recommandée à visée thérapeutique chez le porc est de 100 000 UI/kg/jour pendant 3 à 5 jours (EMA, 2016d). Des sous-dosages ont été rapportés en production porcine, possiblement dus à une mauvaise évaluation du poids des animaux ou d'un manque de précision dans le dosage (Callens et al., 2012; Timmerman et al., 2006). Cependant, des surdosages peuvent également avoir lieu dans cette filière avec l'usage de doses de colistine supérieures aux recommandations de l'AMM (Fleury et al., 2016; Hémonic et al., 2013), probablement pour limiter l'exposition de certains individus à des concentrations sub-thérapeutiques.

En outre, la consommation (rapportée à la biomasse exposée) varie de façon importante entre les pays de l'UE, les plus gros consommateurs étant les pays du sud de l'Europe (Figure 7). Au niveau mondial, il est difficile de déterminer les quantités réelles utilisées notamment en raison du manque de méthodes standardisées pour collecter les données (Rhouma et al., 2016c).

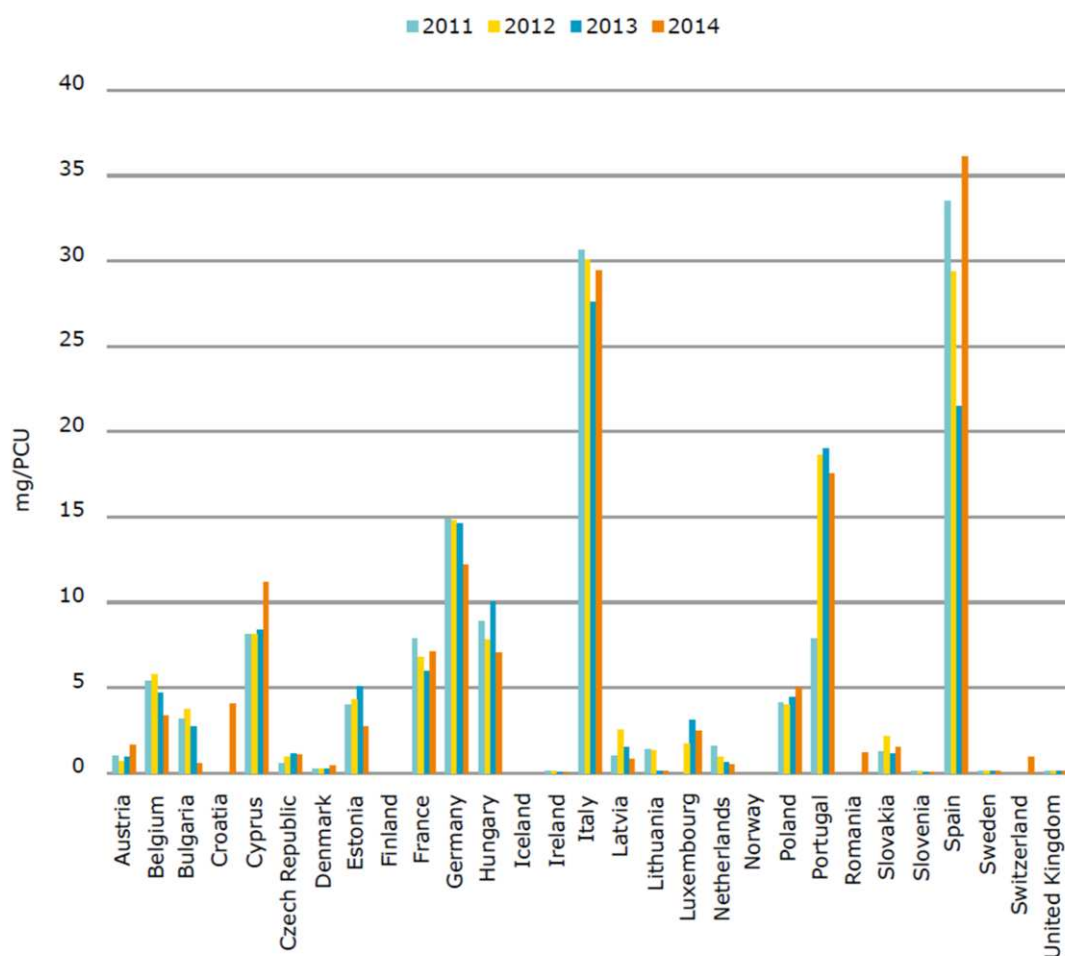


Figure 7: Vente de polymyxines à destination des animaux dans les pays de l'UE, entre 2011 et 2014.

(EMA, 2016c). PCU : « Population Correction Unit » qui tient compte de la population animale ainsi que du poids estimé de chaque animal au moment du traitement antibiotique

Concernant **l'usage de colistine comme facteur de croissance** (voie orale) pour les animaux de production, cette pratique est **interdite en Europe** depuis 2006 pour tout antibiotique. Cependant, certains pays hors de l'Europe, notamment **en Asie, ont recours à cet usage** à des doses sub-optimales (Kempf et al., 2016), entraînant alors un risque de sélection de résistance à cet antibiotique (Katsunuma et al., 2007a).

En 2015, la Commission Européenne, après saisie de l'EMA, s'est positionnée sur les modalités d'utilisation de la colistine par voie orale chez les animaux de productions (EMA, 2015). Ceci a été effectué en raison des disparités de posologies et de temps d'attente existantes entre les pays de l'UE (Catry et al., 2015). Le rapport mentionne que **les indications prophylactiques sont abandonnées** et seuls les traitements métaphylactiques sont acceptés : il s'agit des situations pour lesquelles dans un groupe d'animaux en contact, si certains expriment des

signes cliniques alors que les autres sont suspectés d'être en phase d'incubation, l'ensemble des individus est traité. La Commission précise cependant que la présence du pathogène et/ou de la maladie doit être confirmée dans le groupe d'animaux avant que le traitement ne débute. En outre, la **durée de traitement ne devait désormais pas dépasser 7 jours** et l'indication de traitement des salmonelloses doit être retirée des RCP car les données cliniques ne sont pas concluantes. Au final, le rapport bénéfice/risque de l'utilisation de la colistine par voie orale chez les animaux de rente était considéré comme favorable (EMA, 2015). Une autre décision de la Commission Européenne a été publiée en 2016 afin de **supprimer toutes les AMM des médicaments contenant de la colistine en association avec d'autres antibiotiques par voie orale**, en raison du manque de preuve scientifique sur le bénéfice d'une telle association par rapport à la colistine seule.

Cependant, suite à la découverte de gène de résistance plasmidique à la colistine fin 2015 (sujet développé dans la partie 2.4.2.2), un autre rapport a été produit en 2016 par l'EMA pour évaluer les risques associés à cette découverte (EMA, 2016d). Les conclusions principales de ce rapport ont été la **préconisation d'une baisse globale de l'utilisation de colistine** des pays européens, avec un seuil cible de 5 et 1 mg/PCU pour les forts et moyens consommateurs de colistine, respectivement ; la mise en place de stratégies pour un meilleur usage de la colistine (amélioration de la biosécurité des élevages, etc) ainsi que des alternatives à cette molécule (vaccins...) ; et la recommandation de classer la colistine comme antibiotique d'importance critique. Ces recommandations n'ont pas forcément été reprises au niveau national car par exemple, en France, l'Anses s'est positionnée en faveur de la non-inscription de la colistine parmi les antibiotiques d'importance critique. Parmi les justifications, il est précisé que ce choix, a été fait notamment pour éviter un report d'usage vers autres classes d'antibiotiques, en raison du bénéfice clinique toujours positif pour la colistine, mais tout en soulignant l'importance de diminuer son usage de moitié en 3 ans et d'en renforcer la surveillance (Anses, 2016a). Cependant, ces avis sont susceptibles d'être modifiés à tout moment en fonction de l'avancée des connaissances sur le sujet.

2.2.2. Autres indications

La **colistine peut également être utilisée (sous forme de CMS ou de sulfate de colistine) par voie parentérale** (intra-musculaire) afin de traiter certaines septicémies, mais cette

voie d'administration est minoritaire (Figure 6). Contrairement à la voie orale pour laquelle il n'y a pas d'exposition systémique des animaux (du fait d'une absence de passage de la barrière intestinale), cette voie pose la **problématique des résidus de colistine** dans les denrées issues de ces animaux traités et destinés à la consommation humaine. La mise en place de temps d'attente avant l'abattage de chaque animal traité permet de tenir compte de ce phénomène (cf. 2.5.2).

Enfin une très faible part des médicaments contenant de la colistine sont utilisés chez les animaux de compagnie, par voie topique, pour soigner les infections oculaires ou auriculaires.

2.3. Problèmes de toxicités

2.3.1. Néphrotoxicité

Historiquement, l'usage de la colistine a été abandonné en raison d'une néphrotoxicité élevée. Il est probable que cette toxicité ne soit pas aussi importante qu'anciennement suggérée (Lim et al., 2010) en raison d'un manque d'études pharmacocinétiques et pharmacologiques à propos de cette molécule (Li et al., 2005a). Toutefois, **ce phénomène** n'est pas à négliger car des signes d'insuffisance rénale aigue (IRA) seraient présents dans **des proportions atteignant 60 % des patients traités** avec des polymyxines (CMS ou polymyxine B) (Zavascki and Nation, 2016). Il s'agit de **l'effet indésirable majeur** et limitant dans le choix des doses thérapeutiques.

2.3.1.1. Etudes cliniques et facteur de risques

La toxicité rénale associée à l'usage de polymyxine survient généralement dans les 5 à 7 premiers jours de traitements et est **le plus souvent réversible** après l'arrêt du traitement (Kelesidis and Falagas, 2015). L'augmentation du taux de créatinine sérique est le critère généralement observé dans ces cas-là mais d'autres symptômes tels qu'une hématurie ou une protéinurie peuvent également être présents (Falagas and Kasiakou, 2006).

Une méta-analyse récente comparant polymyxine B et colistine a montré que des signes de néphrotoxicité apparaissaient dans 24 à 74 % des patients traités avec du CMS (Vardakas and

Falagas, 2016). Les auteurs ont également conclu que la néphrotoxicité associée à la colistine était plus fréquente et plus précoce que pour la polymyxine B (Vardakas and Falagas, 2016).

De **nombreux facteurs de risque** de néphrotoxicité ont été mis en évidence comme la dose de CMS utilisée (cumulée ou non), la durée du traitement, l'administration concomitante d'autres agents néphrotoxiques, l'existence de comorbidités, l'âge, la sévérité de la maladie (Fiaccadori et al., 2016; Ordooei Javan et al., 2015; Pogue et al., 2015). Un modèle prédictif a même été développé pour identifier les patients à risque pour cette toxicité (Phe et al., 2014). Cependant, ces résultats ne font pas consensus : en raison des disparités importantes, de la présence de facteurs confondants et le manque d'harmonisation dans la définition de néphrotoxicité entre les différentes études, les facteurs de risque ne sont pas réellement bien définis (Kelesidis and Falagas, 2015; Pogue et al., 2015). Ainsi, une étude rétrospective d'une cohorte de 258 patients traités par la colistine n'a montré aucun lien statistique entre la dose cumulée et la présence d'une néphrotoxicité (prévalence de 10 % dans cette étude) (Falagas et al., 2010). Une autre étude a observé que ce lien existe mais seulement pour les patients avec une fonction rénale anormale (taux de filtration glomérulaire trop bas) (Lee et al., 2015b). Enfin, deux études récentes chez des patient de réanimation ont conclu qu'une concentration plasmatique de colistine à l'équilibre supérieure à 2 mg/L pour l'une (Forrest et al., 2017) et 2,42 mg/L pour l'autre (Horcajada et al., 2016) représenterait le facteur de risque majeur pour l'apparition de la néphrotoxicité. Ceci souligne que **l'index thérapeutique de la colistine est très étroit** car obtenir des concentrations plasmatiques à l'équilibre supérieures à 2 mg/mL est l'objectif pour un effet thérapeutique (Nation et al., 2016).

Concernant les populations pédiatriques, des désordres ioniques tels que une hypomagnésie ou une hypokaliémie sont décrits parmi les effets secondaires les plus fréquents (İpek et al., 2017; Tekgunduz et al., 2015), mais des effets néphrotoxiques sont également rapportés. Ce taux varie entre 0 et 19 % selon les études (Alan et al., 2014; Celebi et al., 2010; Falagas et al., 2009b; Goverman et al., 2007; Iosifidis et al., 2010; Karbuz et al., 2014; Ozsurekci et al., 2016; Paksu et al., 2012) mais cette valeur est, là aussi, difficile à comparer entre étude en raison des disparités dans les doses utilisées. Si une majorité d'études conclut que l'usage de la colistine dans les populations pédiatriques semble globalement sûr, certains auteurs soulignent néanmoins la nécessité d'un suivi rapproché de la fonction rénale durant le traitement (Ozkaya-Parlakay et al., 2015).

Des études se sont intéressées aux biomarqueurs les plus pertinents pour détecter de façon précoce les signes de néphrotoxicité. Le dosage de créatinine sérique est le plus courant mais il existe des limites à son interprétation (Ordooei Javan et al., 2015). Parmi les autres marqueurs plasmatiques prometteurs, le dosage de la cystatin C apparaît plus pertinent que la créatinine ; pour les biomarqueurs urinaires, l'urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) et la kidney injury molecule 1 (KIM1) seraient les plus sensibles (Ordooei Javan et al., 2015).

2.3.1.2. Mécanismes impliqués

La **colistine a tendance à s'accumuler dans les cellules tubulaires proximales**, comme décrit précédemment et il est très fortement suspecté que ce phénomène produit les effets toxiques (Azad et al., 2015a; Azad et al., 2015b). Cette néphrotoxicité induite par les polymyxines se traduit notamment par une **apoptose précoce des cellules tubulaires, un arrêt du cycle cellulaire, une diminution de l'excrétion urinaire et du stress oxydatif** (Abdelraouf et al., 2012; Azad et al., 2013; Eadon et al., 2013).

Pour l'apoptose des cellules tubulaires, l'activation de la voie des caspases liées aux « récepteurs de mort » et aux mitochondries semble être le mécanisme principal in vitro (Azad et al., 2015a). Ceci est corroboré par des études d'imagerie ayant montré que la colistine se fixe, au moins en partie, sur les organites comme les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Yun et al., 2015). L'implication de ces mécanismes, en plus de la voie faisant intervenir le réticulum endoplasmique, dans la néphrotoxicité de la colistine a également été prouvée in vivo chez la souris (Dai et al., 2014) (Figure 8).

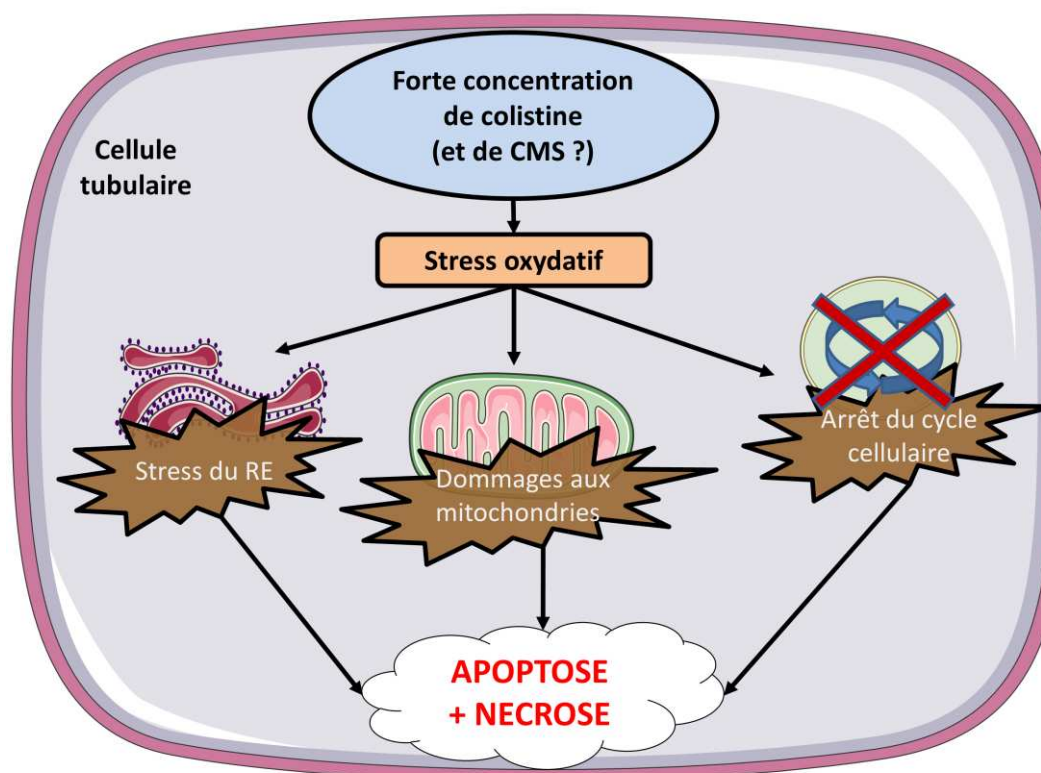


Figure 8 : Principaux mécanismes cellulaires responsables de la néphrotoxicité induite par la colistine (et potentiellement le CMS).

Concernant le CMS, aucun mécanisme actif lié au transport rénal n'a été identifié pour le moment. De plus, il n'est **pas encore défini si le CMS et/ou ses dérivés sulfonés partiels sont néphrotoxiques également**. Il est cependant probable que le rein soit exposé à de fortes quantités de CMS qui soient par la suite converties en colistine (en intra-rénal), et donc contribuent à la toxicité (Zavascki and Nation, 2016).

En bilan, le mécanisme exact lié à la néphrotoxicité reste globalement méconnu et il est par conséquent nécessaire de faire des études complémentaires à ce sujet pour améliorer la sécurité d'utilisation des polymyxines (Nation et al., 2014a).

2.3.2. Neurotoxicité

Des cas de toxicité centrale ont été rapportés dans la littérature jusque dans les années 1990 suite à l'utilisation de polymyxines par voie IV ou IM, se traduisant par de la paresthésie (bénigne généralement) et/ou des épisodes d'apnée (Falagas and Kasiakou, 2006). La neurotoxicité liée à l'utilisation de la colistine serait due à une interaction directe entre la molécule

et les neurones et serait dose dépendante. L'utilisation concomitante des polymyxines avec d'autres médicaments tels que les corticoïdes ou des relaxants musculaires est rapportée comme facteur de risque de cette toxicité. Ces effets neurologiques disparaissent rapidement lorsque le traitement est arrêté (Falagas and Kasiakou, 2006).

Quelques cas de neurotoxicité ont été rapportés après les années 2010, chez des patients atteints de mucoviscidose et traités avec du CMS par voie IV (paresthésie, maux de tête, vertige) (Claus et al., 2015). Les perfusions de CMS effectuées sur une période trop courte (30 min) sont suspectées d'être à l'origine de ces effets toxiques mais un lien avec une diminution de la fonction rénale d'un des patients n'est pas à exclure (Claus et al., 2015). La faible incidence des cas de neurotoxicité est en accord avec la faible pénétration de la colistine dans le système nerveux central, qui a été estimé à 5 % environ chez des patients de réanimation (Markantonis et al., 2009).

2.4. Colistine et antibiorésistance

Comme tout antibiotique, l'utilisation de la colistine a provoqué l'apparition de résistances à l'encontre de cette molécule, que ce soit en médecine vétérinaire ou en médecine humaine.

2.4.1. Méthodes de détection des résistances

Traditionnellement, la sensibilité d'une bactérie à un antibiotique se base sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à cet antibiotique. **La méthode de référence à l'heure actuelle pour déterminer la sensibilité des souches à la colistine** (concernant les Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter* spp) est la **méthode de microdilution en bouillon** (en milieu liquide) selon le standard ISO 20776-1 (EUCAST, 2016). Il est notamment précisé d'utiliser un milieu ajusté en cations, de réaliser le test avec la colistine sulfate (pas le CMS) et d'utiliser du matériel à base de polystyrène. Cependant, en raison de la récente publication sur l'importance des liaisons non-spécifiques de la colistine à ce matériau, il est probable que cette technique de référence soit modifiée prochainement (Karvanen et al., 2017).

Les autres techniques de détermination de la CMI (Etest, etc...) ne sont pas recommandées en raison de leur imprécision (Hindler and Humphries, 2013), notamment à cause de la mauvaise diffusion de la colistine dans les géloses et sa liaison-non spécifique aux matériels plastiques (Kempf et al., 2016).

Les seuils cliniques utilisés pour qualifier une bactérie résistante à la colistine définis par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility and Testing) sont à >2 mg/L pour les Entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* alors que les seuils épidémiologiques donnés par le CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) sont à ≥ 4 mg/L pour ces mêmes bactéries (Kaye et al., 2016).

2.4.2. Mécanismes de résistances à la colistine

2.4.2.1. Résistances chromosomiques

Une partie des résistances acquises à l'encontre de la colistine sont dues à des mutations d'origine chromosomique et n'entraîne théoriquement aucun transfert horizontal de ces résistances, à savoir l'intégration du matériel génétique provenant d'une autre bactérie sans en être le descendant. Le mécanisme le plus courant est la **diminution de la charge négative globale du LPS repoussant ainsi les molécules de polymyxines** (Velkov et al., 2013).

Chez les Entérobactéries, deux systèmes de régulation géniques bi-composés, **PmrAB et PhoPQ**, sont impliqués dans la modification du LPS (Dortet et al., 2016). Ces deux systèmes régulent l'expression de gènes de la famille Pmr qui ont une action sur la biosynthèse de lipide A en y **ajoutant de la phosphoéthanolamine (pEtN) et/ou de la 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N)** (Wright et al., 2015) (Figure 9). Une mutation dans l'un de ces 2 systèmes (ou les deux) conduit à sur-exprimer les gènes Pmr et donc obtenir un LPS plus riche en pEtN et L-Ara4N. Il en résulte **ainsi une charge nette positive du LPS empêchant la colistine d'interagir**. L'implication de ces deux systèmes de régulation a été démontré pour *P. aeruginosa* (Macfarlane et al., 1999; McPhee et al., 2006; Moskowitz et al., 2004). Ces modifications provoquent l'augmentation de la CMI à la colistine, dans une étendue de 3 à 32 mg/L le plus souvent (Dortet et al., 2016) mais des mutations particulières de *pmrB* peuvent provoquer des CMI au-delà de 512 mg/L pour certaines souches (Moskowitz et al., 2012).

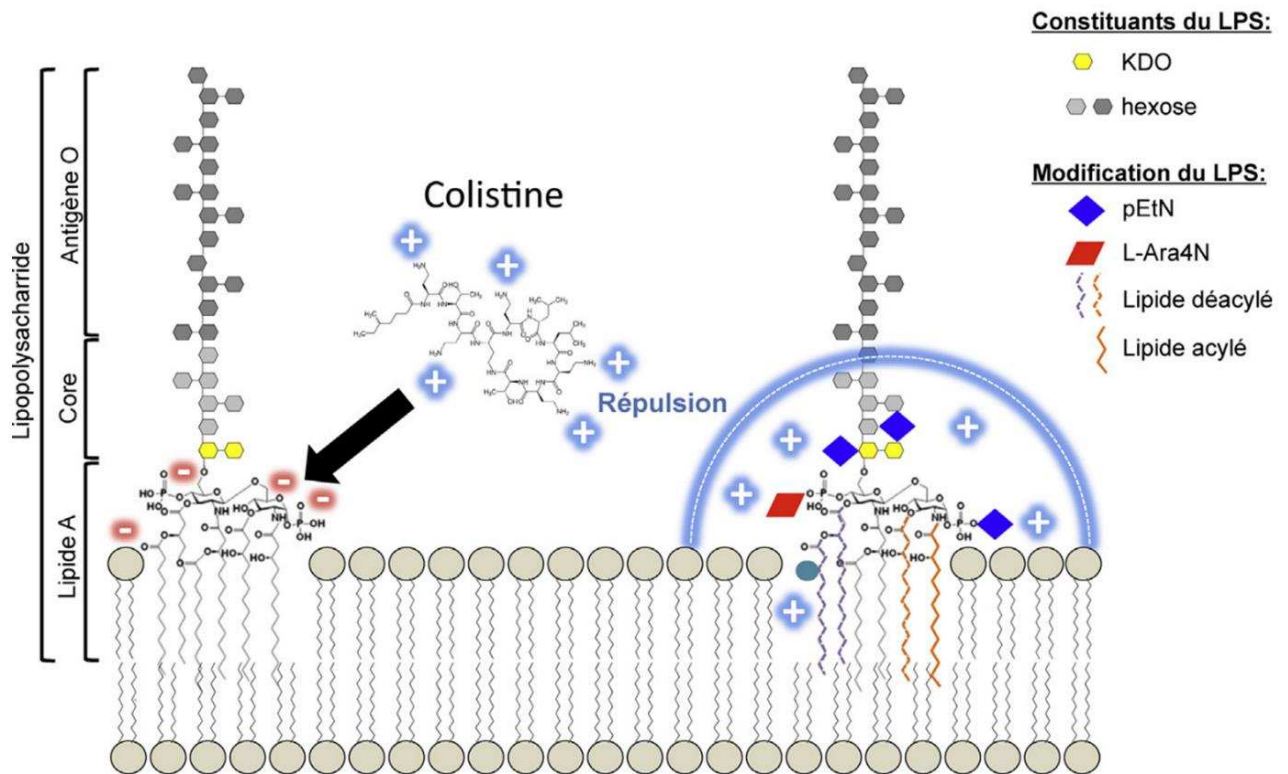


Figure 9 : Mécanismes moléculaires de la résistance à la colistine par modification du lipide A
La modification du LPA par ajout de pEtN et/ou L-Ara4N modifie la charge électrique et repousse ainsi la colistine (à droite). D'après (Dortet et al., 2016).

pEtN : phosphoéthanolamine; L-Ara4N : 4-amino-4-désoxy-L-arabinose. KDO : 2-céto-3-désoxyoctonate

L'activation du système PmrA et PhoP augmente également l'expression du gène *OprH* codant pour une protéine qui occupe les sites de fixation du magnésium sur la membrane empêchant ainsi la colistine de s'y fixer (Macfarlane et al., 2000). **Un autre mécanisme** majoritairement retrouvé chez les entérobactéries est **l'inactivation du gène *mgrB***. Ce gène code pour la protéine MgrB **qui a une activité inhibitrice sur le système PhoPQ** (Figure 10). Lors de mutation de *mgrB*, le système PhoPQ est surexprimé et aboutit, là encore, à un ajout de L-Ara4N sur le LPS (Jayol et al., 2015). L'impact de ce type de mécanisme sur les valeurs de CMI à la colistine est plus important, ainsi les valeurs peuvent atteindre 64 mg/L (Olaitan et al., 2014a).

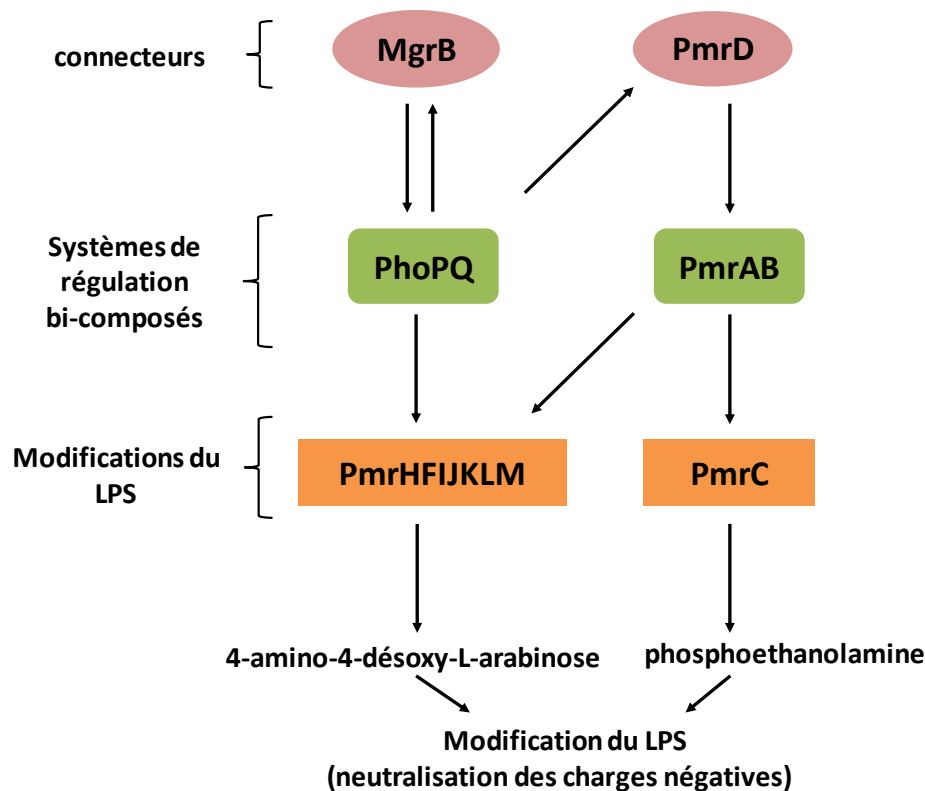


Figure 10 : Diagramme des gènes principaux impliqués dans la résistance à la colistine pour les bactéries Gram négatif

D'après (Wright et al., 2015)

Cependant, certaines souches dont le système PhoPQ a été inactivé développent quand même des résistances à l'encontre de la colistine, **démontrant l'existence d'autres mécanismes encore inconnus** (Lim et al., 2010; Macfarlane et al., 2000). Les autres mécanismes de résistance indépendants de PmrAB et PhoPQ sont ceux impliqués dans la déacylation du LPS (Olaitan et al., 2014b). En outre, divers autres systèmes régulateurs du LPS ont été mis en évidence comme le duo ParR-ParS chez *P. aeruginosa*, qui participe à la mise en place de la résistance adaptative chez les souches en contact avec des concentrations de colistine sub-optimales (Fernández et al., 2010). Globalement, il s'agit **d'autres voies de modification du LPS qui restent encore à mieux étudier**.

Les polysaccharides de la capsule des bactéries pourraient également être impliqués dans les phénomènes de résistance car les polymyxines pourraient s'y lier limitant ainsi leur accès à la membrane. Cependant, cette hypothèse ne fait pas consensus et certaines études la contredisent (Olaitan et al., 2014b). Enfin, l'implication de certaines pompes d'efflux dans la résistance aux polymyxines est également avancée (Srinivasan and Rajamohan, 2013).

Des mutants col-R de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* ont pu être sélectionnés in vitro en faisant des cultures répétées sur des milieux avec concentration croissante de colistine (0,5 à 16 µg/mL), ce qui souligne **la rapidité de sélection sous pression d'antibiotique** (Lee et al., 2015a). Cependant, la stabilité de ces mutations diffère entre les souches puisque après passage répété sur milieu sans colistine, une majorité de *Pseudomonas* testés est redevenu sensible, contre une minorité pour *E. coli* et *Acinetobacter*, et aucune *Klebsiella* (Lee et al., 2015a). **Un coût biologique semble donc associé aux mutations chromosomiques** à l'encontre de la colistine, même s'il ne concerne pas toutes les espèces bactériennes (*K. pneumoniae*). Ceci a été démontré pour des mutations au niveau du système PmrAB in vivo durant un traitement à la colistine ont un coût biologique pour *Acinetobacter*, *baumannii* (Yoon et al., 2013). Moskowitz a montré que certaines souches de *Pseudomonas* très résistantes aux polymyxines (CMI > 512 mg/L) par ce même mécanisme peuvent perdre progressivement cette capacité après plusieurs passages in vitro dans un milieu sans antibiotique, soulignant le fort coût biologique associé à cette résistance (Moskowitz et al., 2012). En conséquence, le coût biologique peut être associé à une baisse de virulence (comme chez *A. baumannii*), mais ceci dépend du mécanisme de résistance impliqué (Beceiro et al., 2014; Pournaras et al., 2014) et la baisse de virulence n'est pas systématique (Durante-Mangoni et al., 2015). Au final, **l'instabilité des résistances chromosomiques a longtemps été avancée comme expliquant le faible risque de diffusion de la résistance à la colistine** (Landman et al., 2008).

2.4.2.2. Résistances plasmidiques

Fin 2015, une équipe chinoise a montré pour la première fois l'existence d'un gène de résistance à la colistine porté par un plasmide, le **gène mcr-1** (Liu et al., 2016). Cette découverte a provoqué une vive réaction de la communauté scientifique internationale car, contrairement aux résistances chromosomiques, il existe un risque de diffusion de la résistance à la colistine par transfert horizontal. En outre, le taux de transfert des plasmides portant mcr-1 dans cette étude avait une valeur élevée, de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-3} (Liu et al., 2016).

Le gène mcr-1 code pour une phosphoéthanolamine transférase qui catalyse l'addition de pEtN sur le lipide A, **provoquant une baisse d'affinité de la colistine pour le LPS** comme pour les résistances chromosomiques (Figure 7) (Liu et al., 2016). Globalement, les niveaux de résistance associés à ce mécanisme semblent modérés, avec des CMI à la colistine entre 4 et 16 mg/L (Poirel et al., 2016). Cependant, une souche de *E. coli* qui hébergeait le gène

mcr-1, avec une CMI à la colistine (1 mg/L) inférieure au seuil épidémiologique a été isolée chez le porc (Fernandes et al., 2016). Cette observation tend à montrer que la détection des souches résistantes à la colistine par un mécanisme de résistance plasmidique de type mcr ne peut se baser uniquement sur les valeurs de seuils épidémiologiques.

Une **diversité importante de plasmides hébergeant mcr-1** a ensuite été mise en évidence, avec des taux de transfert par conjugaison in vitro variables allant de 10^{-10} à 10^{-1} , avec même parfois aucun transfert plasmidique selon les souches (Yang et al., 2017). La majorité de ces plasmides pourrait se transférer aux Entérobactéries à des taux de 10^{-4} à 10^{-6} (Denervaud Tendon et al., 2017), soit de façon moins fréquente qu'initialement avancé (Liu et al., 2016).

Cette multiplicité de plasmides laisse penser que la diffusion de mcr-1 pourrait correspondre à divers événements génétiques distincts survenus de façon indépendante dans des régions géographiques éloignées (Poirel et al., 2016). Il a rapidement été montré que **le gène mcr-1 est présent sur quasiment tous les continents** (Asie, Europe, Afrique, Amérique du Nord) et de façon ubiquitaire puisque porté par des bactéries retrouvées chez l'Homme, les animaux, dans les denrées alimentaires et l'environnement (Wang et al., 2017b).

En outre, le fait que les mêmes plasmides soient retrouvés chez des souches de bactéries de différents types illustre bien une diffusion ancienne (Haenni et al., 2016). En effet, **le gène mcr-1 a été détecté chez des bactéries isolées dans les années 1980 en Chine** (Shen et al., 2016) et au début des années 2000 en Europe (Haenni et al., 2016).

Le réservoir d'origine de mcr-1 est supposé être le monde animal, pour plusieurs raisons (Nordmann and Poirel, 2016) :

- l'usage important de polymyxines chez les animaux de production (cf 2.2.1)
- la prévalence de mcr-1 bien plus importante chez les souches d'origine animale que pour celles isolées chez l'Homme (cf 2.4.3)
- l'association de mcr-1 avec des résistances au florfénicol (antibiotique seulement utilisé en médecine vétérinaire)
- l'association génétique de mcr-1 avec une séquence d'insertion provenant de *Pasteurella multocida* (bactérie pathogène fréquente du monde animal)

En outre, des souches porteuses **de mcr-1 en association avec d'autres gènes de résistances** à l'encontre d'antibiotiques de derniers recours ont été détectées, notamment des **carbapénémases** chez des porcs (alors que l'utilisation des carbapénèmes est interdite chez les

animaux de production) (Pulss et al., 2017) mais aussi chez des entérobactéries isolées chez l'Homme (Poirel et al., 2016). Des co-localisations avec **des β -lactamases à spectre étendu (BLSE)** ont également été observées (Haenni et al., 2016) et ne semblent pas rare en Chine (Bi et al., 2017).

Suite à la découverte du gène *mcr-1*, d'autres éléments génétiques mobiles ont été mis en évidence. **Des variants de *mcr-1*** ont été identifiés, notamment *mcr-1.2* chez une souche de *K. pneumoniae* en association avec des gènes codant pour des carbapénémases (Di Pilato et al., 2016). Le gène ***mcr-2*** a été découvert chez des *E. coli* d'origine porcine et bovine en Belgique (Xavier et al., 2016). Ce gène **code également pour une phosphoéthanolamine transférase**, mais distincte de celle issue de *mcr-1*, avec une homologie de séquence d'environ 70 %. Si le mécanisme d'action est identique à celui de *mcr-1*, son mode de transmission serait différent et pourrait expliquer sa prévalence plus faible (Sun et al., 2017) (cf infra). Le gène ***mcr-3*** a été détecté sur un plasmide chez un *E. coli* d'origine porcine en Asie (Yin et al., 2017). Des analyses comparatives de séquences ont mis en évidence l'existence de ce gène chez d'autres entérobactéries comme *K. pneumoniae* et *Salmonella* isolés chez des patients, soulignant **une diffusion déjà en cours**. Enfin, la forte homologie de séquence avec des gènes présents chez *Aeromonas* laisse penser que *mcr-3* proviendrait de cette espèce bactérienne (Yin et al., 2017). Enfin, très récemment, un gène ***mcr-4*** a été identifié chez *Salmonella* et *E. coli* provenant d'Espagne, Italie et Belgique (Carattoli et al., 2017), illustrant une **dissémination déjà importante de ce gène en Europe**. La **co-existence** de plusieurs types de gène de la famille des *mcr* a été observée chez un *E. coli* multi-résistant d'origine bovine, portant ***mcr-1* et *mcr-3***, sans réelle connaissance sur l'impact d'une telle association sur les niveaux de résistance à la colistine (Hernández et al., 2017)

Enfin la **découverte future de nouveaux gènes de type *mcr*** (ou d'autres gènes) est **hautement probable**, en lien avec les nouvelles techniques de séquençage à haut débit qui permettent une surveillance accrue (Kluytmans, 2017). En outre, certaines souches résistantes ne présentent aucune mutation chromosomique dans les gènes précédemment cités, ni ne portent de gènes transférables identifiés, illustrant ainsi que d'autres mécanismes restent à découvrir (Wang et al., 2017a).

Contrairement aux mutations chromosomiques, la résistance plasmidique associée à *mcr-1* ne semble pas associée à un coût biologique ce qui lui permet de se maintenir, même en l'absence de pression de sélection (Liu et al., 2016).

2.4.3. Prévalence de la résistance à la colistine

2.4.3.1. Chez l'Homme

Les données concernant la résistance à la colistine sont assez variables mais il est observé que **depuis son regain d'intérêt en médecine humaine, la résistance à la colistine a émergé**. Par exemple, en Grèce, la prévalence de souches col-R est passée de 0% en 2007 à 8,1% en 2008 et environ 24,3% en 2009 (Meletis et al., 2011).

Parmi les Entérobactéries, **K. pneumoniae est l'espèce la plus fréquemment associée au développement de résistances** (Ah et al., 2014). Les études multicentriques avancent des taux de prévalence entre 5 et 10 % environ en Europe pour cette espèce (EFSA and ECDC, 2017; Giamarellou, 2016). Pour *A. baumannii*, la prévalence est autour de 4 % en Europe mais avec des forts taux (< 80 %) dans les pays du Sud comme l'Italie ou la Grèce. Concernant *P. aeruginosa*, la prévalence est faible et inférieure à 1 %. Pour *E. coli*, les derniers chiffres du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) pour 2015 sont de 1,1 % de souches résistantes (ECDC, 2016b). Parmi les souches d'Entérobactéries collectées par le programme SENTRY entre 2014 et 2015 dans des hôpitaux du monde entier, la prévalence d'*E. coli* col-R était de 0,4 % sur plus de 13 000 souches et de 4,4% pour *K. pneumoniae* sur plus de 7000 isolats (Castanheira et al., 2016).

Concernant les résistances de type plasmidique, la prévalence chez l'Homme semble globalement faible. Moins de 0,1% des souches d'Entérobactéries du programme SENTRY (cf ci-dessus) étaient positifs pour *mcr-1* (correspondant à 4,9% des souches col-R). Sur un screening de plus de 20 000 isolats de BGN issus du milieu hospitalier en Chine, *mcr-1* a été détecté dans 1% des *E. coli* et <1 % pour les souches de *K. pneumoniae* et *Enterobacter* (Wang et al., 2017b). La même prévalence a été retrouvée chez les *E. coli* issus de volontaires sains dans cette même étude. En outre, une diversité de plasmides et de clones de *E. coli* porteurs de *mcr-1* ont été retrouvés, soulignant une diffusion de ce gène. De façon inquiétante un fort taux de prévalence de souches intestinales portant *mcr-1* (environ 10%) a été observé chez des enfants non-diarrhéiques issus d'un hôpital en Chine (Hu et al., 2017). La caractérisation de ces souches a montré l'existence d'une séquence d'origine aviaire, illustrant une probable transmission depuis le monde animal.

En Europe, l'existence de *mcr-1* dans de nombreux pays a été rapidement reportée (Al-Tawfiq et al., 2017; ECDC, 2016a; Skov and Monnet, 2016) (Figure 11) mais la proportion relative d'isolats d'origine humaine portants *mcr-1* est restée globalement faible (<1%) (EMA, 2016b).

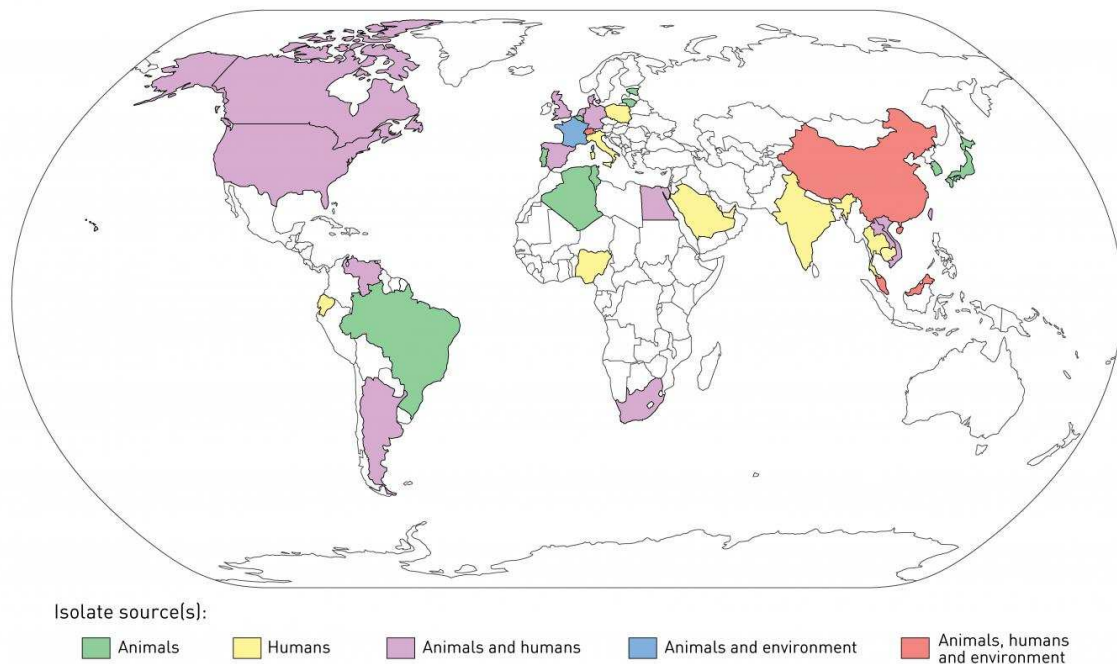


Figure 11 : Pays dans lesquels le gène *mcr-1* a été identifié (2016)

D'après (Al-Tawfiq et al., 2017) et The Center For Disease Dynamics, Economics & Policy (<https://cddep.org>)

Pour les autres variants de *mcr*, il est encore trop tôt pour avoir des données globales de prévalence ; cependant, *mcr-3* a été identifié chez des souches d'entérobactéries isolées chez l'Homme à partir de 2009 au Danemark à des taux inférieurs à 0,1% (Litrup et al., 2017; Roer et al., 2017), mais ces résultats ne sont probablement pas représentatifs de la prévalence en Europe.

2.4.3.2. Chez les animaux domestiques

Les prévalences de bactéries porteuses de résistances à la colistine sont très variables selon les régions du monde. Concernant *E. coli*, considérée comme une bactérie sentinelle du microbiote intestinal, de **forts taux de prévalence sont retrouvés en Asie et notamment en Chine**. Ainsi, une étude rétrospective sur diverses régions de Chine a montré une progression importante de la proportion d'*E. coli* résistants à la colistine d'origine porcine, passant de 7 %

en 2007 à environ 46 % en 2015 (Zhang et al., 2017). En outre, le portage de multi-résistances est fréquent. En production avicole, cette proportion est également importante avec 25 % en 2015 (Zhang et al., 2017). Ces forts taux de prévalence sont potentiellement à rapprocher de **l'usage de la colistine en tant que promoteur de croissance** dans cette région du globe. Par exemple au Japon, environ 52 % de *E. coli* sont col-R dans les fermes utilisant cette pratique contre environ 5 % pour les fermes ne l'utilisant pas (Katsunuma et al., 2007b). Conscient du risque associé à cette pratique et de la découverte de *mcr-1*, la Chine a très récemment interdit l'usage de la colistine comme promoteur de croissance (Walsh and Wu, 2016).

En Europe, les taux de prévalence de col-R chez **les entérobactéries commensales** (*E. coli*) issus d'animaux sains restent **globalement faibles** (<1%) en production porcine et avicole, même si les prévalences individuelles de chaque pays sont assez variable (EFSA and ECDC, 2017; Kempf et al., 2013). A contrario, les proportions de souches résistantes sont plus fortes chez les animaux malades (donc sujets à traitement antibiotique), avec par exemple une prévalence autour de 10 % chez les porcs en Belgique (Boyen et al., 2010). **En France**, le réseau RESAPATH dirigé par l'Anses surveille l'évolution des **souches pathogènes col-R**. Depuis 2010, une **baisse est remarquée dans toutes les espèces de production**, avec par exemple une baisse de 12 à 3 % environ des souches *E. coli* pathogènes col-R isolées de porcs avec infection digestive (indication principale de la colistine) (Anses, 2016b). Ces résultats laissent penser que la diffusion des souches pathogènes (en France) reste limitée. Pour *Salmonella*, espèce bactérienne zoonotique d'intérêt, des prévalences de 1 à 2 % sont retrouvées en Europe, en provenance d'animaux vivants ou de la viande (EFSA and ECDC, 2017)

Concernant plus particulièrement les résistances à la colistine d'origine plasmidique, une augmentation est notée également en Chine passant de 5,2 % en 2009 à 30 % en 2014 chez les *E. coli* issus des productions aviaires (Shen et al., 2016). Des taux alarmants sont détectés dans certaines régions, notamment chez le poulet au Vietnam (environ 60%) (Trung et al., 2017). Chez le porc, **les données de prévalence varient selon les régions géographiques** avec de faibles taux retrouvés en France (0,50%) (Perrin-Guyomard et al., 2016), en Allemagne (1,5 %) (Abdul Momin et al., 2017) ou en Espagne (0,68%) (Quesada et al., 2016) a contrario des prévalences retrouvées en Asie (20,6% en Chine et 22% au Vietnam) (Liu et al., 2016; Nguyen et al., 2016). Cependant, cette discrimination spatiale n'est pas absolue puisqu'une autre étude en Allemagne a montré que *mcr-1* était présent dans 26 % des élevages testés entre

2011 et 2012 (Roschanski et al., 2017), ainsi qu'avec une prévalence de 13 % en Belgique (Malhotra-Kumar et al., 2016). Il faut néanmoins souligner que la comparaison directe de ces prévalences est délicate, en raison des méthodes différentes utilisées pour collecter les souches (pool de fèces ou échantillon individuel). En outre, le taux de prévalence de *mcr-1* n'aura pas le même impact selon la sous-population microbiologique considérée. Ainsi, au Japon la prévalence pour les *E. coli* issus d'animaux de production saine était très faible (<0,1 % sur plus de 9000 souches) (Suzuki et al., 2016) mais ce taux monte à 13 % parmi environ 680 souches pathogènes isolées de porcs malades (Kusumoto et al., 2016). Il est plus probable que ces souches pathogènes aient été exposées à la colistine, et qu'une pression de sélection ait favorisé la présence de *mcr-1*.

Comme pour les souches d'origine humaine, *mcr-1* a été reporté dans des souches issues d'animaux provenant de nombreux pays (Figure 11).

Initialement découvert en Belgique sur des souches originaires d'animaux malades en 2011, *mcr-2* n'a pas été identifié ailleurs. Une étude de prévalence en Allemagne sur la même période n'a détecté aucune souche porteuse de ce gène, contrairement à *mcr-1* (Roschanski et al., 2017). En Chine, *mcr-2* n'a également pas été détecté sur plus de 10 000 isolats de diverses origines (Sun et al., 2017), soulignant une prévalence probablement très faible. Concernant *mcr-3* et *mcr-4* aucune information de prévalence n'est encore disponible en raison de leur très récente découverte.

2.4.4. Impact de la décontamination sélective digestive dans le développement de résistance

Concernant particulièrement l'usage de la colistine en SDD, cette pratique est montrée du doigt car **suspectée de sélectionner des souches col-R** après son application (Bassetti and Righi, 2014). Une étude néerlandaise a étudié l'usage de la SDD comme mesure de contrôle dans un contexte d'épidémie de *K. pneumoniae* avec BLSE pendant 5 ans. En conclusion, une augmentation de la CMI à la colistine des souches ainsi qu'une fréquence plus importante de bactériémies dues à des bactéries col-R ont été observées (Halaby et al., 2013). Cependant, une

méta-analyse a mis en évidence une réduction du nombre de bacilles Gram négatif résistant aux polymyxines lors de l'usage de SDD (Daneman et al., 2013).

Ainsi, il est souvent avancé que dans un contexte de prévalence de résistances aux antibiotiques faible, l'usage de SDD ne semble pas augmenter cette prévalence (Oostdijk et al., 2013; Wittekamp et al., 2015), au contraire de l'usage lors de prévalence forte de souches résistantes (Halaby et al., 2013). Cependant, ces résultats sont **loin de faire consensus** entre les auteurs et nombreux sont ceux qui s'inquiètent de l'impact sur le développement de résistances (Bassetti and Righi, 2014; Bion et al., 2012; Zandstra et al., 2013; Zandstra et al., 2014).

Il est notamment souligné dans ces études un manque de suivi à long terme (sur plus de 5 ans par exemple) de la prévalence de l'antibiorésistance, notamment chez les patients ayant quittés les soins intensifs (van der Meer and Vandenbroucke-Grauls, 2013). Cet aspect n'est pas à négliger puisqu'il a été montré que pendant la SDD, le nombre de bactéries résistantes dans l'intestin pouvait diminuer mais qu'à la fin du traitement, la recolonisation permettait aux bactéries résistantes de proliférer (la résistance à la colistine n'a pas été traitée dans cette étude) (Oostdijk et al., 2010).

Le manque de données sur les souches bactériennes non cultivables du microbiote intestinal, qui sont potentiellement un réservoir de gènes de résistance est aussi mentionné (van der Meer and Vandenbroucke-Grauls, 2013). Une étude s'est penchée sur l'impact de la SDD sur le « résistome » (ensemble des gènes de résistances) intestinal des patients, grâce à des techniques de métagénomique (Buelow et al., 2014). Une augmentation du nombre de gènes de résistances (à la tobramycine) a été observée pendant la SDD et ces gènes étaient en lien avec des éléments génétiques mobiles présents chez des bactéries anaérobies (non cultivables). Ainsi, la SDD peut potentiellement sélectionner et amplifier les gènes de résistance parmi les bactéries commensales du tube digestif, avec par la suite un risque de dissémination aux autres espèces bactériennes.

Enfin, l'usage de la colistine dans la SDD doit être reconsidéré sous un nouvel angle de vue avec la découverte de la résistance plasmidique mcr (Rawson et al., 2016). Une procédure expérimentale sur ce sujet a été menée dans le cadre de cette thèse (cf II. Partie expérimentale).

2.5. Problématiques « One Health » liées à la colistine

2.5.1. Transmission et dissémination de *mcr-1*

La découverte de *mcr-1* a alarmé l'ensemble de la communauté scientifique sur la probabilité de **diffusion des souches résistantes porteuses de ces gènes entre l'environnement, le monde animal et les Hommes**. En l'occurrence, des gènes *mcr-1* ont été retrouvés dans des plasmides similaires des mêmes espèces bactériennes isolées à partir d'animaux de production, de denrées humaines et de l'environnement soulignant une possible transmission entre eux (EMA, 2016d). Plusieurs études supportent cette hypothèse. **Une transmission** d'un *E. coli* non-pathogène porteur de *mcr-1* **entre l'animal et l'Homme** est fortement suspectée en Asie, chez un jeune homme qui nourrissait ses porcs sans vêtements de protection (Olaitan et al., 2016; Olaitan et al., 2015). En Chine, un échange entre animaux de compagnie (chien, chat) et l'Homme est également avancée car des souches identiques d'*E. coli* portant *mcr-1* ont été retrouvées d'une part chez certains animaux et leurs propriétaires (Lei et al., 2017), et d'autre part chez un vendeur d'animaux et ces mêmes animaux (Zhang et al., 2016b). **L'alimentation pourrait également jouer un rôle de transmission de ces bactéries résistantes**. En effet, le portage sain de *E. coli* positif pour *mcr-1* dans les intestins des animaux abattus peut constituer un risque de contamination des viandes : de telles souches ont déjà été retrouvées dans les viandes de diverses origines (Skov and Monnet, 2016). Ces souches peuvent ensuite se retrouver dans le microbiote intestinal du consommateur si la viande est mangée crue ou mal cuite. Pour cette raison, certains auteurs préconisent un temps d'attente « microbiologique » (Rhouma et al., 2016c) en plus du temps d'attente classique lors de l'usage d'un médicament chez un animal de production (cf. 2.5.2).

De plus, la nourriture des animaux semble être une source potentielle de *mcr-1* car des souches porteuses du gène *y* ont été détectées (Lei et al., 2017). La caractérisation des souches positives pour *mcr-1* isolées depuis l'intestin d'enfants en Chine a montré l'existence d'une séquence d'origine aviaire, illustrant une probable transmission zoonotique (Hu et al., 2017). Au Vietnam, des éleveurs de poulet en contact avec des animaux porteurs de *mcr-1* avaient une prévalence significativement plus importante (34,7%) pour ce gène comparé aux éleveurs en contact avec des animaux négatifs (15,5%) (Trung et al., 2017). Enfin, ***E. coli* est l'espèce**

bactérienne principalement porteuse de mcr-1 ; or il s'agit d'une des **bactéries les plus ubiquitaires et transmises parmi le tryptique animal-Homme-environnement** (Poirel et al., 2016).

La globalisation du **commerce des animaux et des produits (denrées, ...) ainsi que le transport de personnes** sont des facteurs probables de dissémination de mcr-1. En effet, il a été prouvé que certains voyageurs revenant d'Asie (là où la prévalence de mcr-1 est la plus forte) portaient de façon asymptomatique des souches positives pour mcr-1 dans leur microbiote intestinal (Bernasconi et al., 2016). Lors de rassemblements de personnes à forte densité, un échange de mcr-1 entre individus est également suspecté (Leangapichart et al., 2016). L'importation des denrées est également pointée du doigt car des souches avec mcr-1 ont été détectées en Suisse à partir de légumes venant d'Asie (Zurfuh et al., 2016) alors qu'aucun gène mcr-1 ni mcr-2 n'a été détecté chez l'Homme dans ce pays (Zurfluh et al., 2017).

Concernant l'environnement, mcr-1 a été retrouvé chez des souches présentes dans les stations d'épuration (Ovejero et al., 2017) et les rivières (Zurfuh et al., 2016), à partir de légumes importés (Zurfuh et al., 2016) ainsi que dans la faune sauvage, chez certaines espèces d'oiseaux migrateurs venant de différents continents (Liakopoulos et al., 2016; Ruzauskas and Vaskeviciute, 2016), et parfois même associé à d'autres gènes de résistance comme des BLSE (Mohsin et al., 2016). Ces résultats illustrent le risque de diffusion de cette résistance à la colistine.

L'utilisation massive de colistine (par voie orale) chez les animaux de production est perçue comme étant un risque majeur de sélection et diffusion de mcr-1 (Poirel et al., 2016; Skov and Monnet, 2016). Cependant, cet effet de causalité n'est pas toujours évident : en France, une augmentation de mcr-1 dans les *E. coli* porteurs de BLSE chez les bovins depuis 2006 est noté malgré une baisse significative de l'usage de colistine dans cette filière (Haenni et al., 2016). L'usage de colistine comme facteur de croissance dans certaines régions du monde devrait être stoppée en raison de son fort risque de sélection de souches résistantes (Rhouma et al., 2016c; Richez and Burch, 2016). Cependant, des *E. coli* porteurs de mcr-1 ont également été retrouvés chez des enfants âgés de 2 ans ou moins, sans historique de traitement avec des polymyxines, ni de contact avec des animaux (Zhang et al., 2016a). En outre, une souche positive pour mcr-1 a été détecté chez un patient aux Etats-Unis alors que la colistine est interdite d'utilisation chez les animaux (McGann et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'usage de

colistine chez les animaux n'est probablement pas le seul déterminant de la diffusion de mcr-1 et que de nombreuses autres voies de contamination existent (Figure 12).

La colistine étant relativement peu utilisée en médecine humaine, certains auteurs affirment que cet usage n'aura probablement qu'un impact limité sur la diffusion entre souches d'origine humaine (Poirel et al., 2016) mais **l'augmentation de son utilisation en médecine humaine** dans les dernières années **pourrait renforcer la pression de sélection et la dispersion de cette résistance portée par mcr-1** (Skov and Monnet, 2016) (cf 2.1.1). En revanche, il est souligné que si la colistine est devenu un antibiotique de dernier recours chez l'Homme, c'est en raison du mésusage et de la sur-consommation des autres antibiotiques ayant entraîné la sélection de bactéries (multi) résistantes (Al-Tawfiq et al., 2017). Or, mcr-1 est fréquemment présent dans des souches portants d'autres résistances à divers antibiotiques (dont des BLSE ou des carbapénémases) (Kuo et al., 2016; Poirel et al., 2016). Certains auteurs avancent même l'hypothèse d'un lien historique entre ces types de résistances, soulignant ainsi que la réduction de l'usage de colistine seule ne suffira pas à prévenir la sélection de mcr-1 (Rhouma and Letellier, 2017). En Chine, une exposition préalable à des antibiotiques est sortie comme facteur de risque positif avec la présence de mcr-1, alors que la colistine n'est pas utilisée en médecine humaine dans ce pays (Wang et al., 2017b). L'existence de gènes de co-résistances plasmidiques avec mcr-1 est l'hypothèse la plus probable pour expliquer ce résultat. En conséquence, **l'usage d'autres antibiotiques à la fois en médecine humaine et vétérinaire pourrait agir en co-sélection** et maintenir/diffuser la résistance à la colistine associée à mcr-1. Ainsi, la gestion du risque lié à l'utilisation de colistine doit ainsi être appréhendée de façon globale, sous le concept « One Health » (Figure 11).

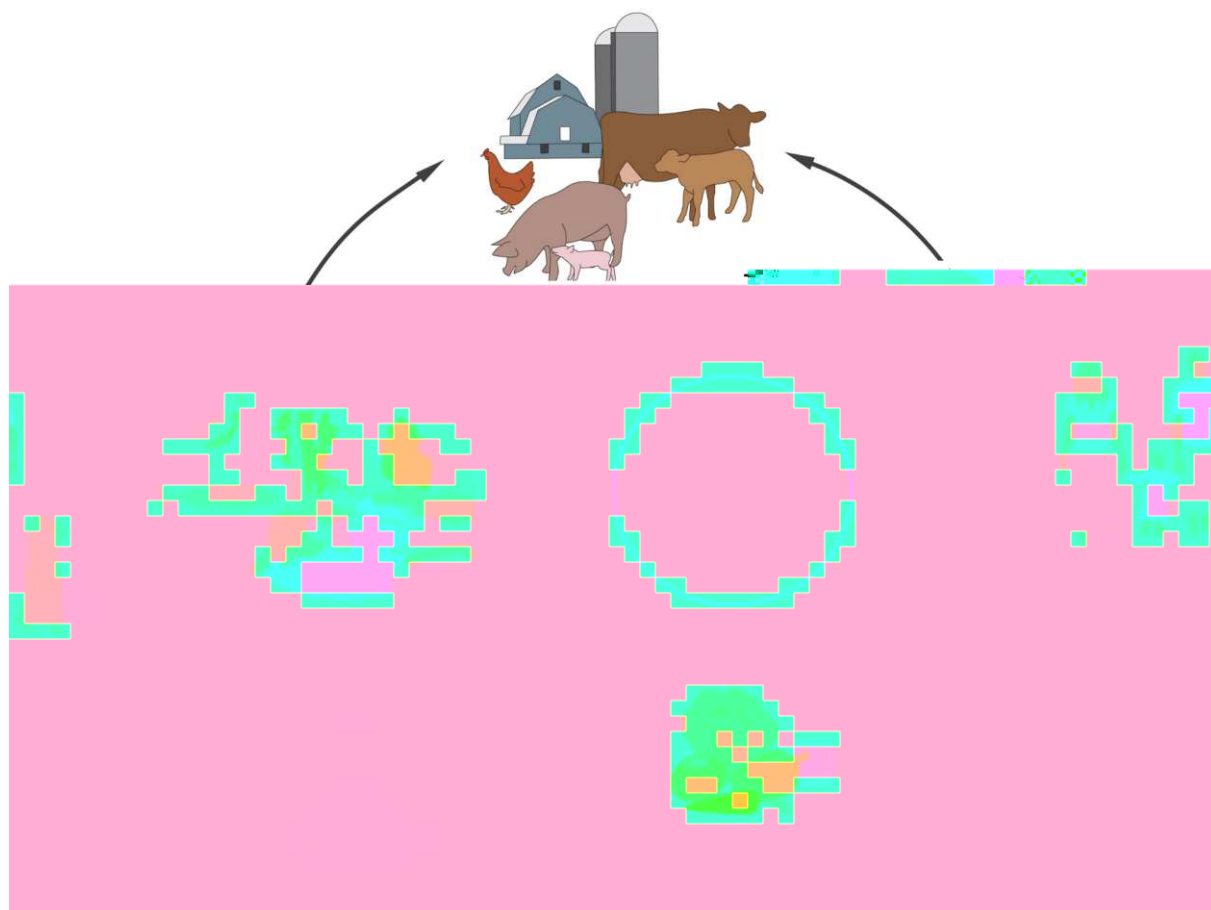


Figure 12 : Différentes voies possibles de dissémination des E. coli porteur de mcr-1 selon le concept "One Health"

D'après (Rhouma et al., 2016c)

Globalement, l'usage important de colistine en médecine vétérinaire (notamment en production porcine), la découverte de gènes de résistance transmissibles (mcr), leurs prévalences plus élevées chez les souches d'origine animale ainsi que leur co-localisation avec d'autres gènes de résistance laissent craindre que la résistance à la colistine puisse se diffuser rapidement, être associée à des bactéries multi-résistantes, et se transmettre à l'Homme.

2.5.2. Résidus et temps d'attente pour la colistine

L'utilisation de colistine chez les animaux de production, à l'instar des autres antibiotiques, peut entraîner la **présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires** d'origine animale. Cette problématique concerne toutes les routes d'administration de la colis-

tine ; cependant la voie parentérale est essentiellement concernée car c'est par cette voie d'administration que des concentrations résiduelles peuvent être retrouvées dans les tissus de consommations.

2.5.2.1. Définition

La notion de « résidu » est définie de façon réglementaire¹ et concerne toute substance pharmacologiquement active présente dans les liquides et tissus des animaux après l'administration de médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux. La présence de résidus d'antibiotique dans ces denrées est **un problème de Santé publique puisque qu'il existe un risque pour le consommateur** (risque toxique, allergique, de sélection/dissémination de bactéries résistantes...). Ainsi, des limites maximales de résidus (LMR) ont été définies pour chaque antibiotique utilisé en médecine vétérinaire, correspondant à des concentrations seuils en résidus dans les denrées à ne pas dépasser pour la protection du consommateur. Ces LMR s'appliquent au principe actif du médicament antibiotique et sont adaptées à l'espèce animale cible du traitement.

Les LMR définies pour la colistine se sont basées majoritairement sur une prévention du risque microbiologique (JECFA, 2006). En effet, le risque toxique direct est faible en raison de la faible absorption digestive de la colistine. En revanche, il s'agit du risque de perturbation de la flore intestinale qui a motivé la définition des valeurs de LMR (Tableau 2).

Tableau 2 : Données de LMR pour la colistine

Tissu	LMR (µg/kg)	Espèces animales
Muscle	150	Bovin, mouton, porc, poulet, dinde, lapin
Foie	150	
Rein	200	
Graisse	150	
Lait	50	
Œufs	300	

¹ RÈGLEMENT (UE) N°37/2010

Ainsi, pour s'assurer que les produits de consommation d'origine animale n'aient pas des résidus en colistine au-delà des LMR, des temps d'attente ont été estimés. Par définition, **les temps d'attente** correspondent au temps entre la dernière administration et la production de denrées, pour lequel **les concentrations résiduelles d'antibiotiques (ou autre principe actif) dans ces denrées sont inférieures ou égales aux LMR**. Pendant ce temps, l'animal ne pourra être abattu et les produits d'origine animale (lait, œufs) ne peuvent être commercialisés.

2.5.2.2. Méthodes de calculs des temps d'attente

Les calculs des temps d'attente en Europe ont été définis par l'EMA et se basent sur une analyse de régression linéaire (EMA, 1996) à partir de données expérimentales de déplétion tissulaires.

Certaines conditions sont cependant nécessaires afin de pouvoir appliquer cette méthode et notamment :

- Homogénéité des variances des données tissulaires log-transformées à chaque temps d'abattage
- Linéarité des données tissulaires log-transformées en fonction du temps
- Distribution normale des résiduelles (différences entre les concentrations observées et les valeurs prédites par la régression linéaire).

Cependant, ces critères à respecter ne sont pas absolus et le non-respect de l'un d'eux ne conduit pas forcément à ne pas utiliser l'approche par régression linéaire : cette méthode doit être préférée à toute autre selon l'EMA (EMA, 2016a).

Même si cette méthode de calcul est communément adoptée, de nouvelles méthodes statistiques sont mises en avant : en premier lieu, les modèles pharmacologiques basés sur la physiologie (PBPK) (Lin et al., 2016). Ces modèles sont intéressants en raison de leur description mécanistique des distributions tissulaires des molécules, qui semble scientifiquement plus pertinente que les méthodes statistiques ou empiriques développées il y a plusieurs décennies (Lin et al., 2016). Ce sujet sera développé dans la partie 3.4.2.

3. La modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK)

3.1. Le concept de la modélisation PBPK

En pharmacocinétique, les modèles couramment utilisés reposent sur un système de compartiments (mono, bi ou tri le plus souvent) dans lesquels le compartiment central représente le plasma et est relié à un ou plusieurs compartiments périphériques. Ces compartiments sont virtuels et n'ont donc généralement aucune signification physiologique mais permettent d'obtenir les paramètres PK primaires tels que les clairances et les volumes de distribution. Cependant, ces modèles reposent sur une base majoritairement empirique.

Une autre approche PK se voulant plus proche de la réalité physiologique et biologique est représentée par la modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie (modèles PBPK). Bien que reposant sur une approche mathématique similaire, ces modèles intègrent des données anatomiques, physiologiques, de mécanismes biochimiques, etc...où les compartiments représentent les organes ou tissus du corps. L'ensemble du modèle est décrit par un système d'équations différentielles respectant la loi d'action de masse et permettant de décrire l'évolution des concentrations en fonction du temps dans chaque tissu. Ainsi, l'intérêt de cette approche réside en sa capacité à décrire la distribution tissulaire des molécules, par exemple pour des organes où l'obtention de données expérimentales est difficile, voire impossible (Liu et al., 2005).

Les modèles PBPK ont l'avantage de reposer sur un cadre mécanistique quantitatif. Ils sont utiles pour les extrapolations, notamment inter-espèces, en adaptant les paramètres anatomiques et/ou physiologiques ainsi que les paramètres biochimiques lorsque l'équipement enzymatique diffère qualitativement et/ou quantitativement entre les espèces. Ils permettent également de générer des simulations de profils PK sous différentes conditions physiologiques ou physio-pathologiques (grossesse, obésité, etc...) (Darwich et al., 2012) et de réaliser des comparaisons intra-espèces (population pédiatrique par exemple) (Johnson et al., 2006). Le concept de la modélisation PBPK n'est pas nouveau mais est en plein essor depuis quelques années, notamment en raison du développement de la puissance de calcul des ordinateurs.

3.2. Elaboration d'un modèle PBPK

Selon le but recherché (développement d'un médicament, essai de toxicité, évaluation du risque d'un contaminant...), les modèles PBPK pourront se différencier de par leur structure, niveau de détail et leur paramétrisation (Chiu et al., 2007).

Plusieurs étapes se succèdent pour la construction d'un modèle PBPK (Espié et al., 2009; Lin et al., 2016) :

- **Le diagramme du modèle**, à savoir la représentation schématique du **modèle structural** traduisant l'ADME de la molécule et **sa description mathématique** par des équations différentielles.
- **La paramétrisation du modèle et sa calibration**, à savoir l'intégration des paramètres mécanistiques (physiologiques, biologiques, physico-chimiques). Deux catégories sont distinguées : les **paramètres indépendants de la molécule étudiée** et les **paramètres dépendants de la molécule étudiée**.
- **La simulation**, qui consiste en la prédiction du devenir de la molécule en fonction d'un schéma posologique particulier, par la résolution algorithmique du système d'équations différentielles (utilisation de logiciels informatiques).
- **L'évaluation du modèle**, pendant laquelle une validation est généralement réalisée en comparant les prédictions obtenues précédemment avec des données expérimentales. Des extrapolations peuvent également être effectuées.

3.2.1. Structure du modèle

La 1^{ère} étape consiste à sélectionner les organes qui seront représentés par un compartiment spécifique dans le modèle, avec une unique combinaison de valeurs des paramètres physiologiques/biologiques spécifiques de l'espèce étudiée. Les organes principaux sont ceux impliqués dans l'ADME de la molécule mais aussi ceux d'intérêt thématique comme les organes où un effet toxique peut survenir ou les tissus à l'origine des denrées en médecine vétérinaire.

Il est possible de représenter tous les organes du corps si besoin afin de développer un modèle PBPK « whole body » (Nestorov, 2007). Le fluide de transport classique est le sang veineux mais il est possible d'ajouter d'autres fluides biologiques lorsque le modèle décrit une fonction bien précise (exemple : le liquide cérébro-spinal, la lymphe,...). Ceci aboutit à la formation d'un diagramme explicatif du modèle (Figure 13).

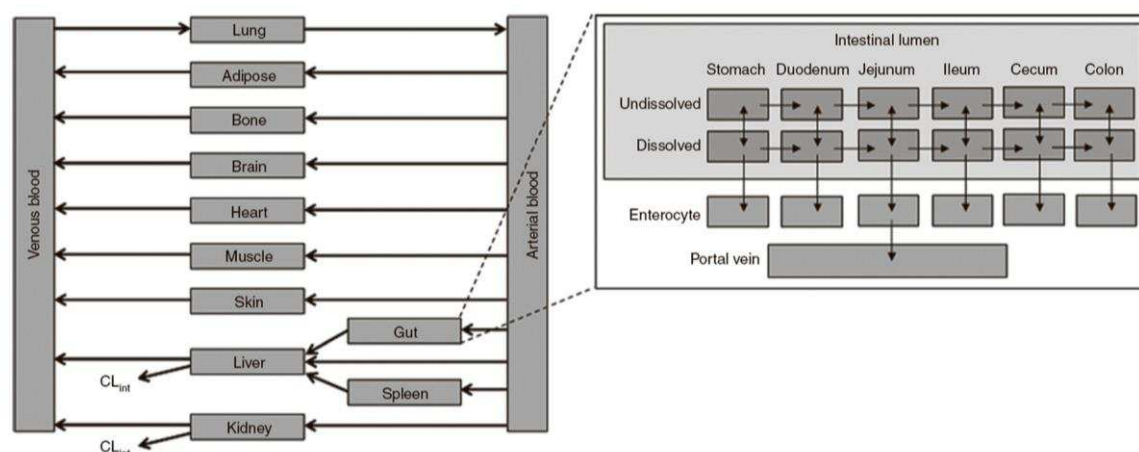


Figure 13 : Structure d'un modèle whole-body PBPK.

D'après (Jones and Rowland-Yeo, 2013)

Il est également possible de regrouper certains organes en un unique compartiment (lumping) lorsque leur séparation n'ajoute aucune valeur pertinente. Ces organes sont alors généralement regroupés en compartiment « reste du corps » ou séparés en un compartiment « richement » ou « lentement perfusé » en fonction de la similarité des cinétiques vis-à-vis de la molécule étudiée. Ce phénomène de lumping permet le développement de modèles « PBPK minimal », qui sont moins complexes (Cao and Jusko, 2012).

En outre, il est possible de détailler les compartiments en décrivant la structure interne de chaque organe en sous-compartiments, relatifs au milieu intra-cellulaire, au milieu interstitiel et à l'espace vasculaire (capillaire) (Peters, 2012). Deux types de modèle différents décrivent alors ce processus (Jones and Rowland-Yeo, 2013):

- **Modèle de distribution limitée par le débit de perfusion :** les membranes tissulaires ne limitent pas la diffusion de la molécule, qui est donc dépendante du débit de perfusion de l'organe. Dans ce cas, on considère qu'il n'y a pas de gradient de concentration à l'intérieur de l'organe (état d'équilibre instantané entre les 3 sous-compartiments). Les 3 sous-compartiments sont alors considérés comme une seule entité homogène (Figure 14 A).

- **Modèle de distribution limitée par la perméabilité** : dans ce cas, la distribution est limitée en raison de la présence de la membrane vasculaire et/ou de la membrane cellulaire entre le milieu extra et intracellulaire. La vitesse pour atteindre l'état d'équilibre dépend alors de la perméabilité spécifique à l'encontre de la molécule. Ce type de représentation permet également de prendre en compte les éventuels transports actifs entre la cellule et le milieu extracellulaire. Ainsi, deux ou trois sous-compartiments sont généralement représentés (Figure 14 B et C).

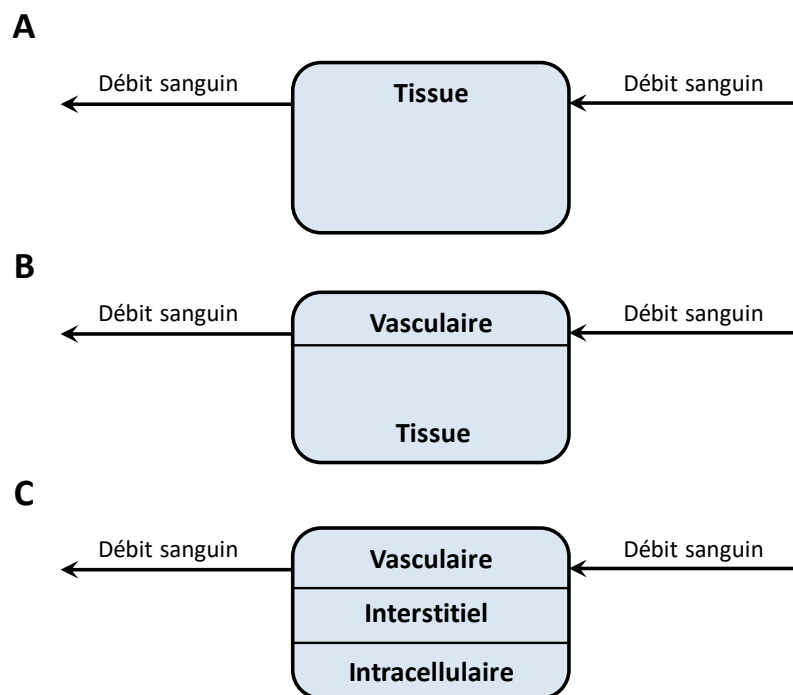


Figure 14 : Modèle débit-limité (A) versus modèles à perméabilité-limité avec 2 (B) ou 3 (C) sous-compartiments.

L'étape suivante consiste en l'expression mathématique du modèle PBPK par le recours à un système d'équations différentielles.

3.2.2. L'expression mathématique générale (modèle débit limité)

Un système d'équations différentielles (SED) est mis en place afin de décrire la totalité des interrelations entre les différents compartiments. Ce système se fonde sur la loi d'action de masse, explicitée par l'équation de Fick (Espié et al., 2009; Jones and Rowland-Yeo, 2013).

De façon générale, l'équation différentielle décrivant les variations de quantités de la molécule en fonction du temps pour un tissu non-éliminateur (sauf le poumon) est :

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = V_{tissue} \cdot \frac{dC_{tissue}}{dt} = Q_{tissue} \cdot (C_{art} - C_{ven}) \quad (\text{Eq. 1})$$

avec A_{tissue} est la quantité dans le tissu considéré ; V_{tissue} : le volume du tissu ; C_{tissue} : la concentration tissulaire ; Q_{tissue} : le débit sanguin ; C_{art} : la concentration artérielle entrant le tissu ; C_{ven} : la concentration veineuse sortant du tissu;

En prenant en compte le coefficient de partage tissu:sang noté Kp qui illustre l'affinité de la molécule pour le tissu (cf. 3.2.3 ci-dessous), la concentration veineuse s'exprime par :

$$C_{ven} = \frac{C_{tissue}}{Kp} \quad (\text{Eq. 2})$$

et l'Eq. 1 devient alors :

$$\frac{dA_{tissue}}{dt} = Q_{tissue} \cdot \left(C_{art} - \frac{C_{tissue}}{Kp} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

Classiquement, les organes éliminateurs dans ces modèles sont le foie et les reins. Ainsi, avec l'exemple du foie, l'élimination métabolique est prise en compte dans l'Eq. 3 telle que :

$$\frac{dA_{foie}}{dt} = Q_{foie} \cdot \left(C_{in} - \frac{C_{foie}}{Kp} \right) - CL_{met} \cdot C_{foie,u} \quad (\text{Eq. 4})$$

avec CL_{met} : la clairance métabolique; $C_{foie,u}$: la concentration libre du foie., C_{in} : la concentration totale à l'entrée dans le foie (qui tient compte de la concentration artérielle hépatique et de celle de la veine porte).

Le même type d'équation est utilisé pour le rein, avec la prise en compte de la filtration glomérulaire et des éventuelles sécrétion/réabsorption tubulaires.

Ainsi, un SED comprenant les équations pour chaque tissu non-éliminateur et éliminateur est obtenu pour décrire le modèle. L'équilibre de masse (mass balance) du système doit être respecté, en s'assurant par exemple que la somme des débits régionaux sanguins est bien égale au débit cardiaque. L'administration de la molécule est également décrite, et les équations qui y sont liées dépendent de la voie d'administration (orale, intra-veineuse, nébulisée,...).

Les équations présentées ci-dessus sont génériques et des complexifications sont possibles pour tenir compte des processus spécifiques à la molécule. Ainsi, d'autres interactions peuvent être précisées dans le modèle, notamment celles liées à des effets bio-chimiques spécifiques comme des transporteurs actifs (Watanabe et al., 2009), des liaisons intracellulaires particulières (Dubbelboer et al., 2017) ou les interactions avec des récepteurs dans le cas des anticorps par exemple (Wong and Chow, 2017).

3.2.3. Paramétrisation du modèle et calibration

Afin de compléter le modèle et le rendre apte à prédire la PK de la molécule étudiée, certains paramètres physiologiques, physico-chimiques et biochimiques sont indispensables. De façon détaillée, on distingue :

➤ Les paramètres indépendants de la molécule

Classiquement il s'agit de paramètres physiologiques : les volumes des organes, les débits sanguins tissulaires et le débit cardiaque sont utilisés. Ces paramètres sont propres à l'espèce ou à la sous-population étudiée (enfants, obèses, femmes enceintes, etc). Ils peuvent être obtenus via la littérature pour l'Homme (Brown et al., 1997; ICRP, 2002) et les espèces animales fréquemment étudiées (Lin et al., 2016), de façon expérimentale ou bien grâce à des méthodes allométriques (cf. 3.4.1.1).

➤ Les paramètres liés à la molécule étudiée

Ces paramètres sont de nature variée (Kp, liaison protéique, métabolisme hépatique enzymatique, etc...) et sont obtenus de diverses manières. Ils peuvent être obtenus par des expérimentations in vitro ou in vivo, l'utilisation de modèles in silico ou à partir d'une combinaison de ces 3 méthodes (Nestorov, 2007). L'exemple des coefficients de partage (Kp) servira à illustrer cette partie.

Afin de bien décrire la distribution tissulaire dans un compartiment à débit-limité, les Kp de chaque organe sont des paramètres indispensables. Les Kp traduisent l'affinité de la molécule pour chaque tissu. De façon plus mécanistique, ce paramètre représente le degré d'accumulation tissulaire dû à différents processus tels que les liaisons protéiques, la séquestration dans les lysosomes, etc. L'expression mathématique est la suivante :

$$Kp = \frac{CSS_{tissue}}{CSS_{sang}} \text{ (Eq. 5)}$$

Où CSS_{tissue} et CSS_{sang} représentent la concentration du composé à l'équilibre dans le tissu et dans le sang respectivement.

Pour obtenir les Kp , la méthode de choix reste la voie expérimentale *in vivo*, notamment chez l'animal. Après une perfusion de l'animal jusqu'à obtenir un état d'équilibre plasmatique et tissulaire pour la molécule d'intérêt, celui-ci est sacrifié et des dosages sont réalisés dans les différents organes et le sang. Cependant, cette méthode reste laborieuse et souvent chère, et n'est pas réalisable chez l'Homme pour des questions d'éthiques évidentes (Nestorov, 2007). Des extrapolations à partir de données *in vitro* ont déjà été utilisées (Ballard et al., 2000). Enfin, des méthodes *in silico* basée sur des « Quantitative Structure-Activity Relationship » (QSAR) ont été développées pour déterminer les Kp , en prenant en compte les caractéristiques physico-chimiques propres à la molécule (lipophilie, etc...) et aux tissus (teneur en différents types de lipides, en eau,...) (Peyret et al., 2010; Ruark et al., 2014; Schmitt, 2008). Ces méthodes permettant de s'affranchir de l'étape expérimentale, donc plus facile, apparaissent cependant moins précises que la détermination *in vivo* (Jones and Rowland-Yeo, 2013).

Enfin, il est possible d'estimer ces paramètres en ajustant le modèle avec un jeu de données expérimentales pendant l'étape de **calibration du modèle** : les paramètres inconnus comme par exemple les Kp sont ainsi estimés (Henri et al., 2017; Sadiq et al., 2016).

3.2.4. Résolution numérique des équations

Le SED représentant le modèle est par la suite résolu grâce à des algorithmes informatiques. De nombreux logiciels sont disponibles pour réaliser cette tâche, certains avec une interface relativement simple d'utilisation mais avec des équations différentielles non modifiables (seule la valeur des paramètres l'est) et d'autres pour lesquels la flexibilité est plus grande pour l'utilisateur, qui doit par lui-même coder l'ensemble du SED (Bouzom et al., 2012; Jones and Rowland-Yeo, 2013).

3.2.5. Evaluation du modèle

Une fois le modèle développé avec tous les paramètres connus, la capacité de prédiction du modèle est testée. **Cette étape de validation** consiste généralement à comparer les résultats prédits par le modèle avec un jeu de données expérimentales externes i.e qui n'a pas servi à l'élaboration du modèle (Jones and Rowland-Yeo, 2013). Une fois validé, le modèle peut être extrapolé à d'autres espèces ou sous-populations particulières (cf. 3.4), en adaptant les paramètres physiologiques et en ajustant le modèle si besoin. Une fois encore, l'extrapolation nécessite ensuite une comparaison avec un jeu de données expérimentales pour validation (Jones and Rowland-Yeo, 2013).

3.3. Limites des modèles PBPK

Pour une description précise de l'ADME d'une molécule, il faudrait intégrer le maximum d'informations sur les processus biologiques et biochimiques impliqués. Ceci implique le développement de modèles de plus en plus sophistiqués qui n'est pas sans poser certains problèmes lors de l'estimation des paramètres inconnus :

- **l'identifiabilité des paramètres** : il peut s'agir d'une non-identifiabilité structurale quand, la correspondance entre les données observées et les valeurs des paramètres estimés n'est pas unique (Yates, 2006). D'autres types de non-identifiabilité existent lorsque les données expérimentales sont trop peu nombreuses et/ou de mauvaise qualité ou bien lorsque les prédictions du modèle sont peu sensibles aux changements de valeurs des paramètres (Hengl et al., 2007). Ces problèmes peuvent par la suite produire des résultats erronés lors de l'usage de ces modèles dans un but d'extrapolation. Parmi les solutions possibles pour s'affranchir de ces problèmes, il est recommandé d'optimiser la collecte des données expérimentales (notamment concernant les temps choisis), enrichir les données, par exemple en ajoutant des mesures pour un tissu sans données préalables, ou encore par le recours à des approches de modélisation faisant intervenir des connaissances a priori sur les paramètres (« prior ») (Gelman et al., 1996).
- **La plausibilité physiologique des paramètres estimés** : L'estimation des paramètres inconnus permet d'améliorer l'ajustement des données observées, mais les valeurs estimées doivent rester physiologiquement réalistes (Tsamandouras, 2015).

➤ **La corrélation des paramètres :** en raison de leur lien physiologique, certains paramètres estimés peuvent être corrélés. Cette corrélation peut entraîner des biais dans les résultats. Afin d'éviter ce problème, il est parfois nécessaire de re-paramétriser le modèle en utilisant moins de paramètres (Tsamandouras, 2015), ce qui est en accord avec l'approche de parcimonie nécessaire lors de la construction de modèle.

3.4. Applications de la modélisation PBPK

3.4.1. L'extrapolation intra et inter-espèces

L'extrapolation inter-espèces est intéressante, notamment lors du développement de médicaments, pour lequel les étapes pré-cliniques font intervenir des études chez l'animal avant de pouvoir extrapoler à l'Homme. En toxicologie également, les études chez l'animal peuvent être utiles pour permettre une extrapolation et une prédiction de l'exposition à une substance chimique chez l'Homme (Sweeney et al., 2009).

En outre, chez l'Homme, l'extrapolation intra-espèces à des sous-populations particulières est également importante afin d'adapter au mieux les traitements pour des problèmes d'efficacité et/ou de sécurité. Comme, il est plus compliqué de mener des études cliniques chez l'enfant que chez l'adulte, le développement d'approches permettant une adaptation des posologies aux enfants est un sujet de recherche important (Knibbe and Danhof, 2011; Mahmood, 2014; Vinks et al., 2015).

Différentes méthodes d'extrapolation peuvent alors être utilisées, pour lesquelles la fiabilité est nécessaire et la pertinence dépend des objectifs des investigateurs.

3.4.1.1. Concept d'allométrie

Les méthodes classiques pour réaliser des extrapolations, sont notamment basées sur l'allométrie qui repose sur le fait que les mammifères ont généralement des anatomie, physiologie, cyto-histologie et biochimie similaires d'une espèce à l'autre. Classiquement, l'allométrie transcrit la relation entre une variable biologique (Y) et son poids (BW) selon une fonction de type puissance telle que :

$$Y = a \cdot BW^b, \quad (\text{Eq. 6})$$

avec $\log a$ et $\log b$ l'ordonnées à l'origine et la pente obtenues à partir de la représentation graphique de $\log Y$ en fonction de $\log W$ (West et al., 1997).

Ainsi en pharmacologie, l'extrapolation intra et inter-espèces la plus communément utilisée pour les paramètres PK se base classiquement sur une relation telle que :

$$X_i = X_{std} \cdot \left(\frac{BW_i}{BW_{std}} \right)^b \quad (\text{Eq. 7})$$

Avec X_i : clairance ou volume de l'individu i cible de l'extrapolation, X_{std} : clairance ou volume de distribution standard de l'individu de référence, BW_i : le poids de l'individu i cible de l'extrapolation, W_{std} : le poids standard de l'individu de référence, b = le coefficient d'allométrie.

La valeur de l'exposant (b) est de 0.75 pour la clairance et de 1 pour un volume selon « l'allométrie théorique » (Anderson and Holford, 2008), en lien avec des concepts de géométrie fractale, permettant de prédire le métabolisme des différentes espèces animales ayant une large amplitude de taille et poids (West et al., 1997). D'autres auteurs considèrent que l'exposant pour la clairance est de 0,67 (soit $2/3$) car la relation entre taux métabolique basal des mammifères et la masse corporelle suivrait cette loi (White and Seymour, 2003). Enfin, dans de nombreuses études cet exposant a été estimé et peut prendre diverses autres valeurs (« allométrie empirique ») (Huang et al., 2014). Il n'y a pas de réel consensus sur la valeur de ces exposants, certains auteurs affirmant que les données expérimentales prouvent que cette notion d'exposant universel n'est pas justifiée (Mahmood, 2010; White et al., 2007) alors que d'autres assurent qu'en raison des imprécisions liées à l'estimation de ces exposants, les valeurs obtenues ne seraient pas significativement différentes des valeurs d'allométrie théorique (à savoir 0,75 pour les clairances par exemple) (Anderson and Holford, 2008).

Concernant l'extrapolation de l'adulte à l'enfant, de nombreux autres modèles allométriques ont été développés en se focalisant essentiellement sur la clairance qui est le paramètre majeur pour adapter la dose en fonction de l'âge (revue par (Mahmood, 2014)). (Mahmood, 2014)). Même s'il n'y a pas consensus sur la méthode à utiliser, l'extrapolation basée sur l'allométrie théorique (exposant 0,75) semble la plus fréquemment admise pour les prédictions de clairance chez les enfants de plus de 5 ans (Mahmood, 2014). Cependant, la comparaison et l'évaluation de ces différents modèles, pour adapter les posologies à l'enfant a montré qu'aucun d'entre eux n'était réellement satisfaisant pour extrapoler sur l'intervalle entier de l'enfance (du

nourrisson à l'adolescent) (Johnson, 2008; Mahmood, 2014) car ces relations allométriques ne prennent pas en compte la maturation des organes. Une tendance à surestimer la clairance en dessous d'un certain âge pendant lequel les processus de clairances sont encore immatures est observée (Edginton and Willmann, 2006). Dans ce cas, un paramètre de maturation (MF) peut être introduit (Edginton et al., 2013) tel que :

$$CL_{enfant} = CL_{adulte} \cdot \left(\frac{BW_{enfant}}{BW_{adulte}} \right)^{0.75} * MF \quad (\text{Eq. 8})$$

Avec CL_{enfant} : clairance chez l'enfant à prédire, CL_{adulte} : clairance d'un adulte standard ; BW_{enfant} : poids de l'enfant ; BW_{adulte} : poids de l'adulte standard (70 kg), MF : facteur de maturation

Cependant, le facteur MF doit être connu ou bien estimé de façon rationnelle. Il peut être soit compris entre 0 et 1, soit représenter une fonction de maturation plus complexe de type sigmoïde (Anderson and Holford, 2011), mais ce paramètre est considéré par certains comme empirique et non basé sur des réalités physiologiques (Mahmood, 2011). D'autres types de modèles ont été développés pour ces populations très jeunes sans qu'aucun ne soit réellement plus pertinent que les autres (Mahmood et al., 2014). L'utilisation d'une relation allométrique où l'exposant varie en fonction de l'âge serait le plus simple d'utilisation pour une première approche.

Ainsi, de nombreuses méthodes d'extrapolation basées seulement sur l'allométrie sont utilisées pour extrapoler à d'autres sous-populations, notamment pédiatriques. Ces méthodes ont l'avantage d'être relativement simples d'utilisation. Cependant, certains auteurs considèrent ces relations allométriques, notamment avec l'exposant 0,75, comme étant trop théoriques et source de complication de calcul pour un résultat non significativement différent d'une simple relation linéaire au poids (Fisher and Shafer, 2016). La modélisation PBPK, qui repose sur une base plus mécanistique et physiologique, apparaît donc comme une alternative intéressante pour réaliser ce type d'extrapolations (Edginton et al., 2006; Johnson, 2008; Mahmood, 2014)

3.4.1.2. Modèle PBPK et extrapolation aux populations juvéniles

La modélisation PBPK apparaît comme un outil pertinent dans l'extrapolation inter-âge (Barrett et al., 2012; Edginton et al., 2006). Pour construire ces modèles, il est préférable de renseigner tous les facteurs impliqués dans l'ADME de la molécule étudiée et de les adapter en fonction de la sous-population considérée. C'est la capacité des modèles PBPK à prendre en compte les changements physiologiques liés à l'âge (croissance, maturation des organes, etc) d'une manière mécanistique qui permet une extrapolation inter-âge plus rationnelle (Emoto et al., 2015).

Pour l'extrapolation aux populations pédiatriques, une des approches classiquement utilisées passe par le développement du modèle PBPK d'abord chez l'adulte en utilisant les paramètres dépendant de la molécule et les paramètres liés à l'adulte (Maharaj and Edginton, 2014). Une fois le modèle validé chez l'adulte (i.e. confronté à des données observées), l'extrapolation se fait à l'enfant, en accord avec plusieurs postulats (Maharaj and Edginton, 2014) :

- Les mécanismes de clairance sont identiques entre l'adulte et l'enfant : si certaines isozymes particulières du foie sont impliqués dans le métabolisme chez l'adulte, les mêmes seront utilisées dans le modèle enfant.
- La structure du modèle est similaire.
- Les facteurs d'ontogénie sont basés sur des sujets sains en premier lieu (adaptable chez des sujets malades par la suite).
- La variabilité des paramètres physiologiques et biochimiques est considérée comme similaire entre adulte et enfant (sauf si des données sur certains paramètres prouvent le contraire).

L'adaptation du modèle aux populations pédiatriques découle de la nature mécanistique des modèles PBPK : les paramètres inhérents à la molécule restent constants tandis que les paramètres spécifiques à la sous-population considérée (paramètres physiologiques, biochimiques...) sont adaptés. Ces données chez l'enfant sont majoritairement disponibles dans la littérature (Edginton et al., 2006; ICRP, 2002).

La clairance est un paramètre qui nécessite une attention particulière lors d'extrapolation en raison de son influence majeure sur l'exposition à la molécule (Maharaj and Edginton, 2014; Mahmood, 2014). La prise en compte de l'état de maturation des mécanismes liés à la clairance est nécessaire et ceci peut être renseigné grâce aux informations d'ontogénie. Par exemple, lorsqu'une molécule est principalement éliminée par le foie selon un mécanisme identifié, les

taux des isoenzymes impliquées doivent être modifiés en fonction de l'âge (Maharaj and Edginton, 2014).

Les simulations obtenues sont ensuite comparées aux données pédiatriques s'il en existe afin de les valider ou de réajuster le modèle si nécessaire ; sinon, ces simulations pourront être utilisées comme indications à propos de l'influence de l'âge sur la PK de la molécule. Cependant, l'immaturité inhérente aux populations pédiatriques concernant les mécanismes d'élimination ou de métabolisme est la plus marquée pour les individus les plus jeunes (nouveau-nés, nourrissons). Ainsi, un modèle validé pour des enfants plus âgés n'est pas forcément adapté pour une population plus jeune et ne pourra être utilisé pour réaliser des prédictions fiables sans adaptations supplémentaire (Maharaj and Edginton, 2014).

Afin d'extrapoler de l'adulte à l'enfant, plusieurs études ont comparé des méthodes se basant sur l'allométrie classique ou sur des modèles PBPK (Mahmood et al., 2017; Mansoor et al., 2016). Globalement, le recours aux modèles PBPK s'est avéré être une approche plus satisfaisante (moins biaisée) pour l'extrapolation, en lien avec les paramètres de maturation physiologique qu'il incorpore (volume des organes, débit sanguins, espace vasculaire et interstitiels ainsi que les variations des cinétiques enzymatiques liées à la métabolisation/élimination de la molécule). L'avantage tient donc dans la réalité physiologique des paramètres du modèle en opposition avec les lois allométriques qui ont une base plus empirique, même si les auteurs soulignent que ces résultats ne sont peut-être pas transposables à toutes les molécules et que les prédictions liés à ces modèles PBPK n'apparaissent pas toujours meilleures que celles basées sur l'allométrie seule (Mansoor et al., 2016). Il faut cependant souligner que le concept d'allométrie est, d'une certaine manière, inhérent aux modèles PBPK puisque les paramètres physiologiques (volumes des organes, ...) de ces modèles sont généralement exprimés en fonction du poids corporels.

La modélisation PBPK apparaît ainsi comme un outil d'aide pour déterminer les doses optimales à utiliser chez l'enfant, qui est de plus en plus présent au niveau réglementaire (Barrett et al., 2012). Cependant, comme tout modèle, une confrontation des prédictions avec des données observées obtenues dans les populations pédiatriques est souhaitable pour valider ces modèles (Johnson et al., 2006). En outre, le développement de logiciels intégrant des bases de

données physiologiques et l'influence de l'âge sur ces paramètres permet de réaliser plus aisément l'élaboration de modèles PBPK juvéniles (Johnson and Rostami-Hodjegan, 2011; Khalil and Laer, 2011; 2014)

3.4.1.3. Modèle PBPK et extrapolation inter-espèces

Concernant l'extrapolation inter-espèce, l'usage de relations allométriques sur les paramètres PK (clairance et volume de distribution) ne semble pas efficace lorsque l'ADME est espèce-dépendante du fait de l'intervention de protéines spécifiques (transporteurs, enzymes de phase I et II et protéines plasmatiques), ou pour des molécules avec une forte liaison protéique et/ou avec une sécrétion rénale active importante (Huang et al., 2014). Globalement, l'allométrie apparaît comme une méthode simple et rapide pour extrapoler des paramètres pharmacocinétiques entre espèces différentes, mais n'est pas une approche optimale pour prédire la cinétique plasmatique ou tissulaire dans les différentes espèces (Lin et al., 2016) car elle repose sur des bases empiriques à l'inverse des modèles PBPK. Un autre désavantage de ces lois est qu'elles permettent une prédiction moyenne mais ne sont pas adaptées pour des prédictions de variabilité inter-individuelle.

Ainsi, en sus de l'extrapolation intra-espèce (cf ci-dessus), les modèles PBPK peuvent être utilisés pour de l'extrapolation inter-espèces, notamment de l'animal vers l'Homme. L'intérêt des modèles PBPK repose sur leur plasticité à s'adapter aux variations importantes de physiologie propre à chaque espèce (Figure 15).

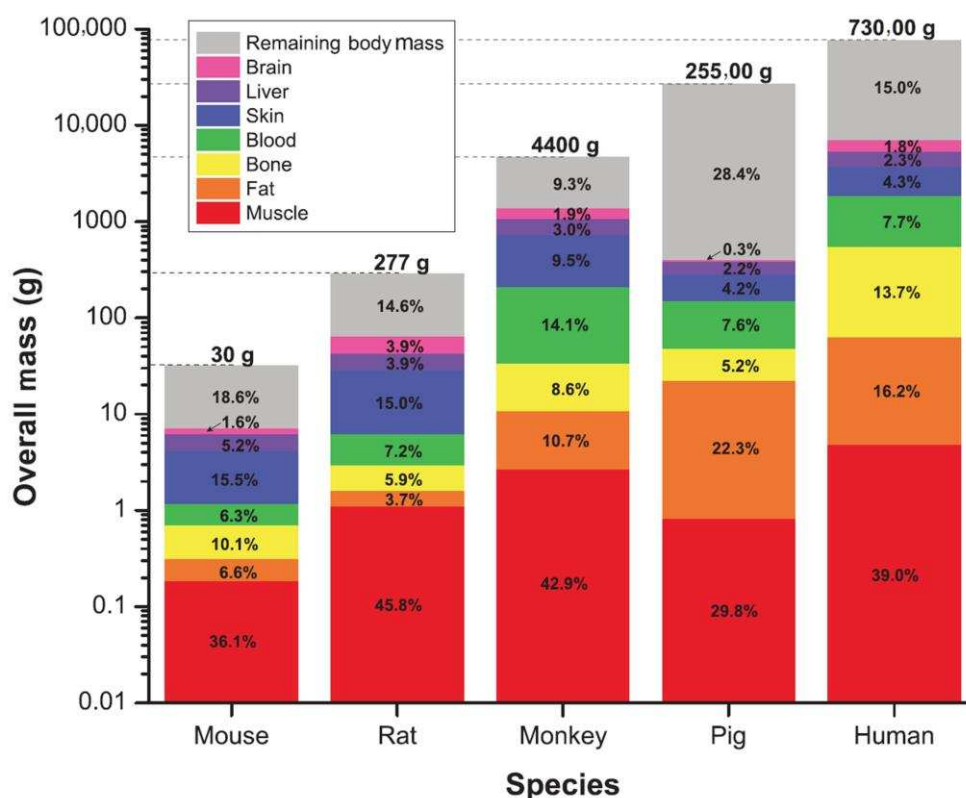


Figure 15 : Comparaison des poids des organes principaux entre animaux de laboratoire et l'Homme.

Le poids corporel standard de chaque espèce ainsi que la fraction de poids relative de chaque organe sont représentés. « Remaining body mass » se réfère aux organes et autres parties du corps non mentionnés. D'après (Hall et al., 2012)

La démarche est similaire à l'extrapolation de l'adulte à l'enfant, à savoir que le modèle est d'abord développé dans une espèce particulière puis extrapolé à l'Homme en adaptant les paramètres physiologiques et les paramètres relatifs à la molécule si nécessaires.

De nombreuses études se sont intéressées à l'extrapolation inter-espèces via des modèles PBPK afin de prédire la PK chez l'Homme (Hall et al., 2012; Hu et al., 2014; Kagan et al., 2011; Parrott et al., 2011; Thiel et al., 2015) et les différentes méthodes utilisées sont décrites ci-dessous.

Hall et al. se sont basés sur une méthode très mécanistique afin de prédire la bio-distribution de la cyclosporine dans divers organismes (Hall et al., 2012). A partir de données expérimentales limitées chez le rat, ils ont développé une extrapolation vers de plus gros animaux et enfin à l'Homme. Brièvement, certains mécanismes biologiques ont été considérés comme étant constants entre les différentes espèces, notamment les phénomènes de bio-transport (par exemple la cinétique de dissociation de la fraction liée aux érythrocytes) et de transfert de

masses (coefficient de transfert de masse à l'interface tissu/sang) tandis que les données physiologiques et anatomiques étaient adaptées à l'espèce considérée. Cette approche s'est avérée satisfaisante pour l'ensemble des prédictions et semble donc valide pour des molécules dont le transport et les réactions biochimiques associées sont similaires entre espèces. Dans le cas contraire, l'obtention de données supplémentaires sur l'espèce considérée est nécessaire. Pour cet objectif, l'extrapolation in vitro-in vivo (IVIVE) combinée à la modélisation PBPK est une approche rapide, moins coûteuse et éthiquement souhaitable à condition de maîtriser les changements d'échelle (Rostami-Hodjegan, 2012).

Une autre étude a montré que plus le nombre d'informations préalables en lien avec la molécule étudiée est important, plus le modèle est performant dans son extrapolation à une autre espèce (Thiel et al., 2015). Ainsi, en prenant l'exemple de 10 molécules, Thiel et al. ont réalisé une extrapolation de la souris vers l'Homme en prenant en compte les différences d'espèces pour 4 types de paramètres :

1. Les paramètres physiologiques
2. La fraction libre plasmatique
3. Les paramètres cinétiques des principales voies d'élimination/excrétion
4. Le taux d'expression des gènes dans les tissus, illustrant l'abondance des d'enzymes impliqués dans le métabolisme ou le transport des molécules

Il est ressorti de cette étude que le meilleur résultat d'extrapolation était basé sur les modèles englobant l'adaptation de ces 4 types de paramètres simultanément par rapport aux modèles avec adaptation d'un, de deux ou de trois de ces types de paramètres uniquement (Thiel et al., 2015). Ces résultats soulignent l'importance d'une connaissance avancée de l'ADME de la molécule étudiée pour obtenir des prédictions plus fiables.

On peut également remarquer que les concepts d'allométrie classique sont parfois associés à des modèles PBPK pour extrapoler les paramètres inconnus chez l'Homme. Ainsi dans le développement d'un modèle PBPK pour l'alvespimycine chez la souris et l'extrapolation à l'Homme, les clairances ont été extrapolées à l'Homme grâce à une relation allométrique avec un exposant de 0,67 (Hu et al., 2014).

Enfin l'extrapolation combinée inter-espèces et inter-âges grâce à la modélisation PBPK est une approche intéressante pour extrapoler vers l'enfant. Cette méthode a prouvé son efficacité pour l'oseltamivir (Parrott et al., 2011). Les différentes étapes ont consisté en premier lieu au développement d'un modèle PBPK chez le ouistiti adulte, qui a ensuite été extrapolé à l'Homme adulte en suivant les mêmes hypothèses utilisées pour l'animal et en tenant compte des particularités d'espèce. La même démarche a ensuite été réalisée chez le ouistiti juvénile, en prenant en compte les changements physiologiques dus à l'âge. Puis une extrapolation a été faite pour l'enfant, en tenant compte des ajustements effectués pour le modèle animal juvénile. Ce type d'approche ayant recours à un modèle PBPK développé chez des animaux adultes et juvéniles pour extrapoler à l'enfant a été également utilisé par d'autres auteurs (Yang et al., 2014).

Cette méthode a été soulignée comme étant pertinente pour l'objectif d'extrapolation mais se heurte à certaines limites. Le choix de l'espèce permettant une telle extrapolation est important, à savoir un animal ayant des mécanismes relatifs à l'ADME proches de ceux de l'Homme (Barrett et al., 2012). Les primates peuvent être utilisés dans cet objectif mais des exigences réglementaires et les coûts limitent ce choix. Le porc apparaît ainsi de plus en plus comme une alternative pertinente pour la réalisation d'études chez le juvénile (Bode et al., 2010; Gasthuys et al., 2016; Swindle et al., 2012; Van Peer et al., 2015)

3.4.2. Estimation des temps d'attente en médecine vétérinaire

Comme vu dans la partie 2.5.2, l'estimation des temps d'attente se fait par des analyses de régression linéaire après log-transformation des données de déplétion. Cependant, la modélisation PBPK est de plus en plus utilisée en recherche dans ce domaine car, par définition, c'est une méthode qui décrit la distribution tissulaire des molécules notamment dans les organes destinés à la consommation humaine. Parmi les avantages de cette méthode, la possibilité d'intégrer différentes voies d'administration ou de prendre en compte les effets d'une maladie (Leavens et al., 2014) dans les prédictions du modèle en font une approche plus « réaliste » que la méthode statistique traditionnelle utilisant un nombre limité d'animaux sains (Lin et al., 2016). De nombreuses publications ont démontré les avantages d'une telle approche dans l'estimation des temps d'attente (revue de ces publications par (Lin et al., 2016)). Ces modèles ont notamment été utilisés pour déterminer les temps d'attente pour des espèces mineures, comme par exemple pour l'oxytétracycline chez le mouton (Craigmill, 2003) ou encore estimer les

temps d'attente lors d'usage de posologies de pénicilline en dehors des autorisations de mise sur le marché (Li et al., 2017).

L'usage de simulations de Monte-Carlo permet en outre de prendre en compte la variabilité des paramètres physiologiques en leur associant une distribution statistique (normale ou log-normale) associée à une moyenne et un écart-type. Ceci permet de réaliser des prédictions adaptées pour une population large d'animaux (comme en élevage), plutôt qu'uniquement pour des individus moyens (Li et al., 2017).

4. Objectifs de la thèse

Plusieurs problématiques en lien avec les différents usages de colistine en médecine humaine et vétérinaire ont été abordés lors de cette thèse. Ces aspects peuvent être schématiquement séparés selon la voie d'administration de la colistine (ou du CMS) :

A. Administration par voie orale, sous forme de colistine, et problématique d'antibiorésistance

A.1. L'usage massif de colistine en médecine vétérinaire par voie orale est considéré comme exerçant une pression de sélection sur les souches résistantes à la colistine, et cette pratique est contestée notamment depuis la découverte du gène plasmidique *mcr-1*. La filière porcine est largement concernée par cette problématique, car elle figure parmi les plus gros utilisateurs de cette molécule afin d'enrayer les infections digestives en post-sevrage (EMA, 2016d). En raison de ses propriétés physico-chimique, la colistine n'est pas ou très peu absorbée par la barrière intestinale des porcs (Rhouma et al., 2015) et donc l'exposition directe du microbiote intestinale est forte. Les conséquences d'un traitement sur la sélection des souches col-R et des gènes de résistance tel que *mcr-1* sont mal connues dans les élevages porcins (Rhouma et al., 2016a) et seront explorées dans cette première partie expérimentale.

A.2. Chez l'Homme, la colistine par voie orale est également utilisée, pour des raisons prophylactiques de décontamination sélective digestive (SDD). Cet usage est sujet à controverse quant à son implication dans le développement de bactéries résistantes dans le microbiote intestinal des patients. Avec la découverte de *mcr-1*, cet aspect nécessite une exploration plus poussée et sera l'objet de la 2^e partie expérimentale, par le recours à un modèle de rat hébergeant un microbiote intestinal d'origine humaine.

B. Administration par voie systémique, sous forme de CMS, et exploration pharmacocinétique

B.1. Afin d'améliorer les connaissances sur l'ADME du CMS et de la colistine, un modèle PBPK a été développé chez le porc après administration systémique de CMS. Ce type

de modèle permet de décrire de façon mécanistique la distribution tissulaire des molécules, notamment dans le rein, lieu où la toxicité de cette molécule s'exprime. Le porc a été choisi en raison de sa grande proximité physiologique avec l'Homme mais aussi car la colistine est également utilisée en médecine vétérinaire. En effet, l'administration par voie systémique de CMS est minoritaire mais existe en production porcine. Se pose alors le problème des résidus de colistine retrouvés dans les viandes, et la détermination des temps d'attente lié à l'usage de cette molécule est nécessaire. Le modèle PBPK développé chez le porc a été appliqué pour cet objectif.

B.2. L'administration du CMS par voie systémique est de loin la plus fréquente en médecine humaine. Cependant, son utilisation engendre un risque d'apparition d'une toxicité rénale non négligeable et l'optimisation de la dose administrée est donc primordiale. Or pour certaines sous-populations, comme les patients pédiatriques, peu de données cinétiques sont disponibles permettant d'optimiser les doses de colistine à utiliser, sans risque pour les patients. Ainsi, l'adaptation de posologie pour la population pédiatrique reste un sujet d'importance. Grâce au modèle développé chez le porc adulte, une étude de l'influence de l'âge sur la PK du CMS et de la colistine a été réalisée sur des porcelets d'âges différents (extrapolation inter-âges). Puis, un travail d'extrapolation inter-espèces à l'Homme et l'enfant a été initié.

La synthèse des objectifs de cette thèse est présentée dans la Figure 16.

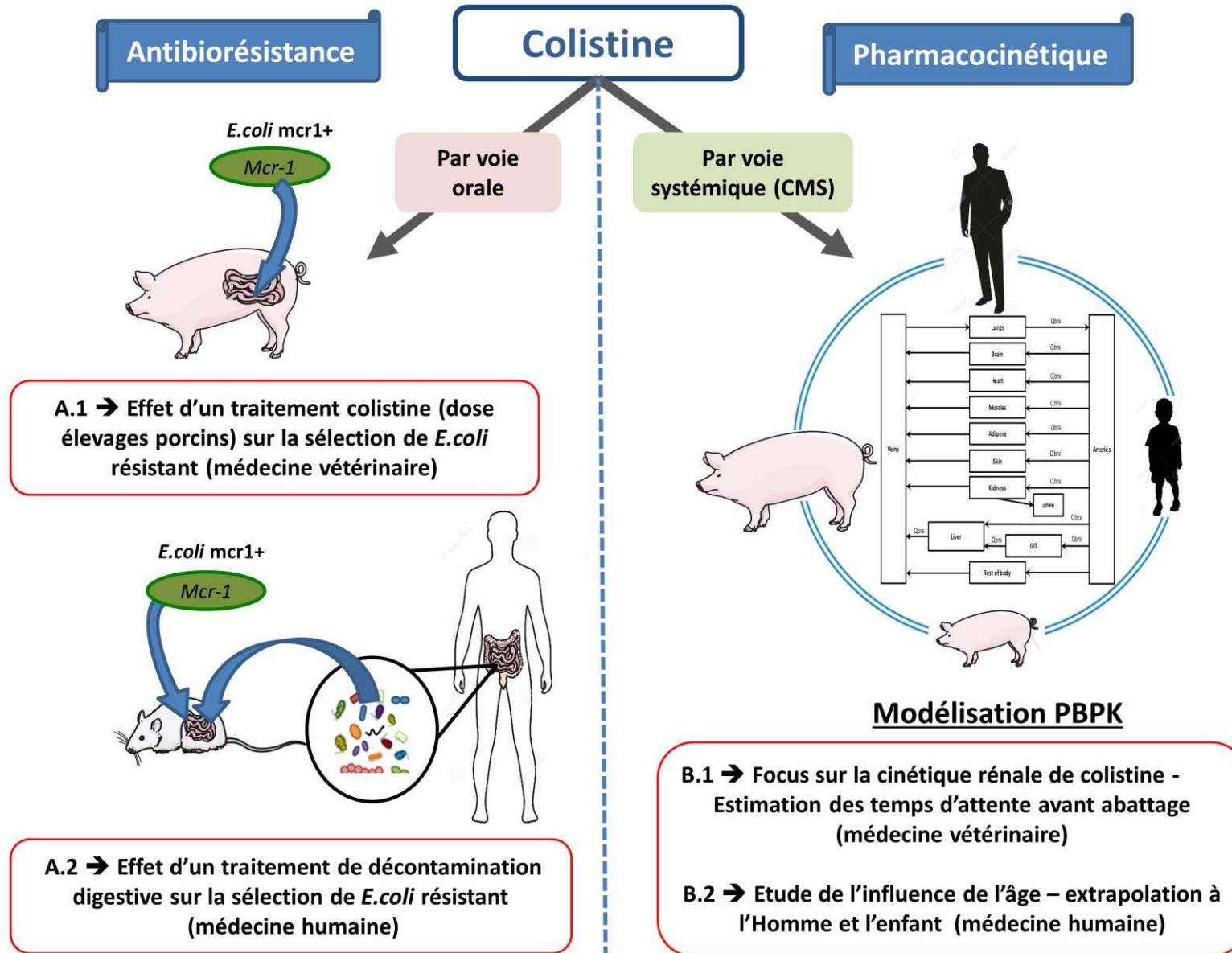


Figure 16 : Objectifs de la partie expérimentale de la thèse

II. Partie expérimentale

5. Antibiorésistance et usages de colistine par voie orale

5.1. Impact d'un traitement à la colistine chez le porcelet hébergeant un *E. coli* positif pour *mcr-1*

5.1.1. Introduction

L'usage massif de colistine chez les animaux de production, notamment le porc, est sujet à controverse depuis la découverte de la résistance plasmidique *mcr-1*. Il est craint qu'une sélection de souches col-R puis une dissémination via l'environnement et l'alimentation entraîne l'apparition d'infections bactériennes chez l'Homme pour lesquelles aucun antibiotique ne sera efficace. Une étude expérimentale a donc été menée afin d'explorer l'usage spécifique de la colistine par voie orale chez le porc et ses conséquences dans la sélection de *mcr-1*.

5.1.2. Etude préliminaire

En premier lieu, il a fallu élaborer un modèle de porcelet hébergeant de façon asymptomatique une souche de *E. coli* porteuse du gène *mcr-1* dans son microbiote intestinal. L'objectif était de mimer la présence de ce gène à bas bruit dans un élevage porcin conventionnel.

5.1.2.1. Matériels et méthodes

- Animaux

Douze porcelets tout juste sevrés (âgés de 3 semaines) ont été utilisés car ils sont la cible majoritaire des traitements per os à la colistine dans cette espèce. Ces animaux provenaient d'un élevage de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), et ont été élevés dans des conditions conventionnelles. Ces porcelets n'ont reçu aucun traitement préalable avec des polymyxines avant leur inclusion dans l'étude.

- Souches bactériennes col-R

Deux souches *E. coli* (n°391 et 2305) isolées à partir de prélèvements intestinaux de porcs sains à l'abattoir (dans le cadre du plan de surveillance commandité par le ministère de l'Agriculture français) (Perrin-Guyomard et al., 2016) ont été sélectionnées en raison de leur résistance à la colistine médiée par le gène *mcr-1* (confirmé par PCR). Ces souches avaient toutes les deux une CMI à la colistine de 8 mg/L. Une PCR sur l'extrait plasmidique de la souche (PureLink HiPure Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific, Dardilly, France)) a permis de confirmer la localisation plasmidique de *mcr-1*. Le type de plasmide hébergeant le gène *mcr-1* n'a toutefois pas été caractérisé à ce jour.

Ces deux souches ont en premier lieu été rendues résistantes à la rifampicine par culture en bouillon supplémenté avec de la rifampicine à 250 mg/L (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), afin de pouvoir les discriminer aisément sur milieux de culture sélectifs. En effet, la sélection de souche col-R dans les géloses est techniquement difficile en raison de la mauvaise diffusion de la colistine dans ce milieu (Rhouma et al., 2016c), ce qui peut biaiser les résultats. En outre, les bactéries lors de notre étude ont été isolées à partir de prélèvements fécaux dont les composants sont susceptibles d'inhiber l'activité de la colistine (Fleury, 2015). Après avoir vérifié la CMI des souches à la rifampicine (>512 mg/L), une analyse PCR a confirmé que ces souches avaient toujours le gène *mcr-1* malgré cette nouvelle résistance induite. L'usage de gélose Mc Conkey (ThermoFisher Scientific, Dardilly, France) avec rifampicine (à 200 mg/L) s'est avéré efficace pour isoler ces souches mutées.

- Essai de conjugaison in vitro

La capacité des deux souches (n°2305 et 391) à transférer leur plasmide portant *mcr-1* par conjugaison a été testée in vitro en milieu liquide avec une souche réceptrice *E. coli* J5 (notée ECJ5) résistante à la rifampicine (CMI> 250 mg/L) (Weill et al., 2004). Afin de pouvoir discriminer ECJ5 des deux souches donneuses, ces dernières ont été utilisées avant leur induction d'une résistance à la rifampicine (comme décrit dans le paragraphe sur les souches bactériennes utilisées) et ont été discriminées par leur résistance à la colistine.

Les souches donneuses ainsi que la souche réceptrice ECJ5 ont été mises individuellement à incuber dans des tubes contenant du bouillon LB (Luria Bertani, ThermoFisher Scientific) sous agitation à 37 °C pendant une nuit. Puis 600 µL de chaque tube a été transféré dans un

nouveau tube de bouillon LB (un pour chaque souche) et incubé à 37°C sous agitation pendant 1 h pour obtenir des bactéries en phase de croissance exponentielle. Après vérification par densité optique de la concentration attendue ($1,5 \cdot 10^9$ bactéries/mL), 2 mL provenant du tube de la souche donneuse ont été mélangés avec 2 mL provenant du tube de la souche réceptrice (ratio 1:1 entre donneuse et réceptrice) et mis en incubation pendant 24 h à 37°C sans agitation. D'autres ratios ont également été testés à savoir 1:10 et 1:100 entre donneuse et réceptrice. Enfin, 2 mL du mélange entre donneuse et receveuse a été dilué et étalé sur une gélose Mueller Hinton contenant de la rifampicine (32 mg/L) et de la colistine (2 mg/L) afin de discriminer les éventuels transconjugants.

- Optimisation de l'implantation des souches résistantes chez le porcelet

Pour chacune des deux souches (n°2305 et 391), deux protocoles d'inoculation chez le porcelet ont été testés : une taille d'inoculum faible $1 \cdot 10^8$ UFC/ml et une taille d'inoculum forte $1 \cdot 10^{10}$ UFC/ml. Trois porcelets ont été utilisés par protocole soit 12 au total.

L'inoculation se faisait par gavage grâce à une sonde gastrique, avec une solution saline de 5 mL contenant l'inoculum approprié. Deux inoculations séparées de 24h ont été faites pour chaque animal (D0 et D1). Puis des prélèvements réguliers de fèces ont été réalisés sur une quinzaine de jours.

- Effet d'un traitement à la colistine par voie orale sur la sélection des souches inoculées

A l'issue de l'étape précédente, le choix du protocole d'inoculation optimal a été effectué et les animaux correspondants ont été gardés pour la suite de l'expérimentation (3 animaux par souche, soit 6 animaux au total). Ces porcs ont été traités à partir du 20^e jour après l'inoculation. Le traitement consistait à l'administration par gavage de sulfate de colistine (Acti Coli, Biove, Arques, France), à la posologie recommandée en médecine vétérinaire (100 000 UI/kg en 2 administrations/jour) pendant 3 jours (durée minimale de traitement selon le RCP). La voie d'administration par gavage a été privilégiée afin de contrôler de façon précise la dose administrée, contrairement à la voie classique par l'eau de boisson ou l'alimentation. Des prélèvements de fèces ont été effectués pendant et jusque 9 jours après la fin du traitement, afin de quantifier les bactéries précédemment inoculées.

- Analyses bactériologiques

Le suivi des quantités de souches *E. coli* porteuses de *mcr-1* dans l'intestin des porcelets s'est fait grâce à des prélèvements individuels réguliers de fèces fraîches (par stimulation anale) et dénombrements bactériens. Brièvement, des prélèvements d'environ 1g de fèces ont été broyés puis dilués dans du sérum physiologique. Enfin, les dilutions appropriées ont été étalées sur les géloses Mc Conkey contenant de la rifampicine. La limite de détection (LOD) était de 50 UFC/g de fèces.

5.1.2.2. Résultats

- Essai de conjugaison in vitro

Aucune colonie n'a poussé sur le milieu supplémenté avec à la fois de la rifampicine et de la colistine, quelque soit le ratio entre souche donneuse et receveuse, soulignant ainsi l'absence de souches de type transconjugant.

- Optimisation de l'implantation des souches résistantes chez le porcelet

Les résultats des différents protocoles d'inoculation de souche bactérienne sont présentés dans la Figure 17. Les deux souches (n°2305 et 391) se sont implantées correctement quel que soit l'inoculum et n'ont pas été éliminées sur la période de suivi (environ 15 jours). Malgré la variabilité importante, l'implantation de la souche n°391 est apparue relativement plus stable que l'autre souche, et a donc été préférée pour la suite de l'étude. Afin de confirmer le choix de cette souche, un traitement court à la colistine par voie orale a été effectué pour évaluer son impact in vivo sur chacune des deux souches.

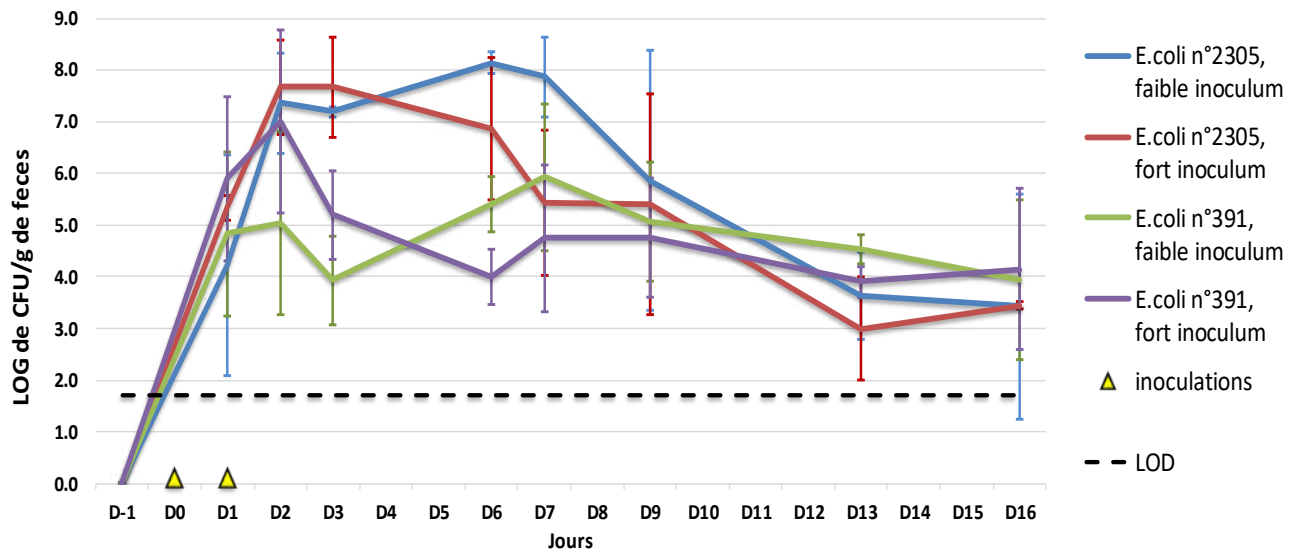


Figure 17 : Dénombrement fécal des souches de E. coli inoculées (deux tailles d'inoculum pour chaque souche) au cours du temps.

Faible inoculum : 1.10^8 UFC/ml ; fort inoculum : 1.10^{10} UFC/ml

- Effet d'un traitement à la colistine par voie orale sur la sélection des souches inoculées

Les porcs ayant reçu le faible inoculum (3 porcs pour chaque souche) ont été traité à partir du 20^e jour après l'inoculation

Des prélèvements de fèces ont été effectués pendant et 8 jours après la phase de traitement, afin de quantifier les bactéries inoculées comme précédemment décrit (Figure 18).

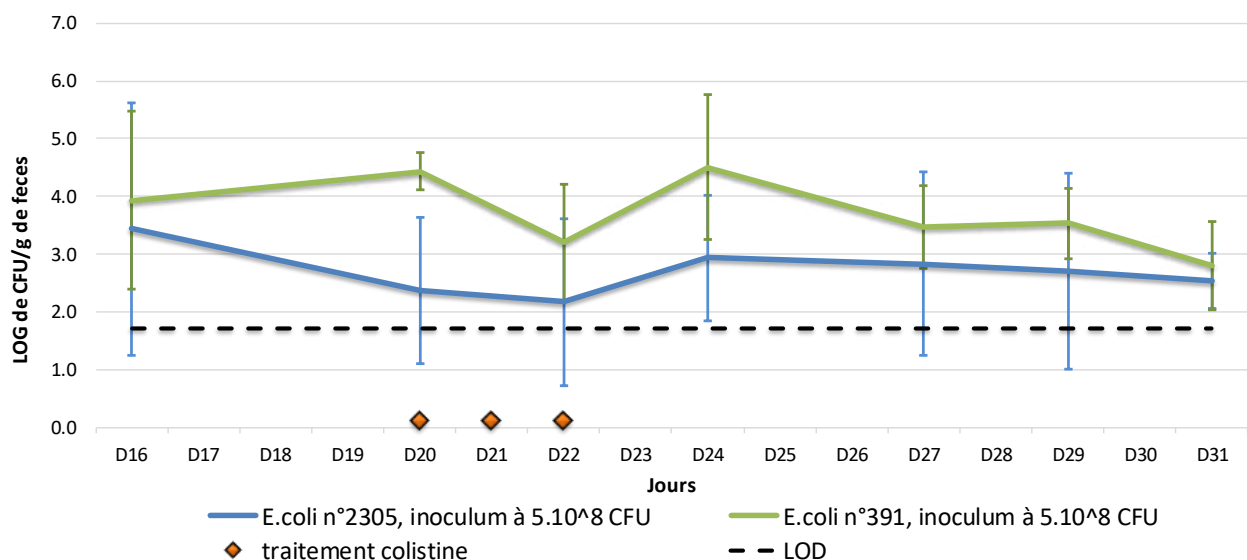


Figure 18 : Dénombrement fécal au cours du temps des souches de E. coli inoculées et impact d'un traitement à la colistine.

L'inoculation avait été effectuée 20 jours avant le début du traitement. Le traitement à la colistine était de 100 000 UI/kg/j divisés en 2 administrations.

Les 3 jours de traitement à la colistine ont provoqué une légère baisse des *E. coli* inoculées pendant la phase de traitement mais de façon non significative. En outre, peu de différences ont été notées dans l'évolution des quantifications des *E. coli* n°391 et 2305 avec ce traitement à la colistine. En lien avec les conclusions du paragraphe précédent, c'est la souche n°391 qui a finalement été conservée pour l'étude principale. Elle a été dénommée ECmcr1+ dans le reste du document.

Une fois ce protocole d'inoculation optimal obtenu, l'étude principale a été menée chez d'autres porcelets sevrés. L'objectif a été d'évaluer l'impact d'un traitement colistine, à la dose recommandée et à une surdose utilisée en élevage, sur la sélection de cette souche ECmcr1+ en parallèle de l'effet sur les *E. coli* totaux. En outre, un suivi des concentrations fécales en colistine a été effectué.

5.1.3. Article publié (étude principale)

Cet article a été publié dans l'International Journal of Antimicrobial Agents.

Lack of experimental evidence to support *mcr-1*-positive *Escherichia coli* strain selection during oral administration of colistin at recommended and higher dose given by gavage in weaned piglets

Alexis Viel^{a,b,c}, Jérôme Henri^c, Agnès Perrin-Guyomard^c, Julian Laroche^{a,d}, William Couet^{a,b,d}, Nicolas Grégoire^{a,b,*}, Michel Laurentie^c

^aInserm U1070, Pôle Biologie Santé - Bât. B36/37, 1 rue Georges Bonnet, Poitiers, France

^bUniversité de Poitiers, UFR Médecine-Pharmacie, 6 rue de la Milétrie, Poitiers, France

^cAnses, Laboratoire de Fougères, 10B Rue Claude Bourgelat, Fougères, France

^dUniversité de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, Poitiers, France

* Corresponding author

Tel.: +33 5 49 36 64 36.

15-mail address: nicolas.gregoire@univ-poitiers.fr

25 **Highlights**

- 26 • Piglets harbouring *mcr-1*-positive *Escherichia coli* were treated orally with colistin
27 • Recommended European dosage and double dosage of colistin were given by gavage
28 • No selective effect of colistin on *E. coli* was observed in our experiments

29

30 **Abstract**

31 In this study, we assessed the selective effect of colistin orally administered to healthy weaned
32 piglets harbouring an intestinal *mcr-1*-positive *Escherichia coli* strain. Maximum
33 recommended dose and a higher dose often used in European pig farms were given by

positive strain was observed in our controlled conditions

ations in real farming conditions seem necessary.

Escherichia coli; piglets; selection

34 gavage. No selection of the *mcr-1*-

35 whatever the dose. Further investig

36

37 **Keywords:** colistin; *mcr-1*; *Escher*

38

39 1. Introduction

40 Colistin is an old polypeptidic antibiotic widely used in food-producing animals, especially in
41 pig production as oral group treatment and metaphylaxis against Enterobacteriaceae digestive
42 infections after weaning. Colistin is also used in human medicine as a last resort antibiotic
43 against multi-drug bacteria. The first plasmid-mediated colistin resistance gene (*mcr-1*)
44 discovered in China at the end of 2015 [1] has raised concern about the risk of spread of this
45 resistance. Few months after, *mcr-1* was detected in all continents, both in human and animals
46 [2]. European Medicines Agency emphasized the need of reducing colistin use in animal and
47 proposed to class colistin as critically important antimicrobials [3]. Scientific community
48 lacks of in vivo data about *mcr-1*, especially in commensal Enterobacteriaceae to properly
49 characterize the public health risk. We assessed here in piglets the selective effect of
50 controlled colistin oral treatments on commensal intestinal *Escherichia coli* harbouring a *mcr-*
51 *1*-positive strain with monitoring of faecal concentrations.

52

53 2. Materials and methods

54 2.1. Animals and housing

55 Fifteen Large White-Landrace-Piértrain piglets were used to carry out the experiment, with no
 56 history of antimicrobials treatments. They were weaned at 21 days old and then fed with a
 57 standard non-medicated ration and had free access to water. After 5 days of collective
 58 housing, they were put in individual boxes with no possible contact (8 days before treatment,
 59 D-8).

61 2.2. Bacterial strain and inoculation

62 The original strain was a colistin-resistant *E. coli* (MIC = 8 mg/L) isolated from the intestines
 63 of a healthy pig sampled in a French slaughterhouse [4]. This strain harbouring *mcr-1*
 64 (confirmed by PCR) was made rifampicin-resistant (MIC > 512 mg/L) by spontaneous
 65 mutation before inoculation and named ECmcr1+. The inoculation phase consisted of three
 66 gavages (at D-7, D-5 and D-2) of 5 mL of about 10⁷ CFU/mL of ECmcr1+ in saline
 67 suspension.

69 2.3. Experimental treatment and sampling

70 Piglets were randomly divided into three groups of 5 animals and force-fed with colistin
 71 sulphate (Acti-coli, Biové, Arques, France) using a polyethylene tube, from D0 to D4 (5
 72 days). RD group (for maximum Recommended Dosage) received 100 000 UI/kg/day [5]
 73 equivalent to 3 mg/kg/day of colistin base activity (CBA) [6], given twice a day as 1.5 mg/kg
 74 in 5 mL solution; HD group (for Higher Dosage often found in pig farms [7]) received
 75 200 000 UI/kg/day equivalent to 6 mg/kg/day of CBA, given twice a day as 3 mg/kg in 5 mL
 76 solution; the placebo group received water. Fresh faecal samples were taken on mornings
 77 (after anal stimulation) from the day before ECmcr1+ inoculation (D-8) until 19 days after the

78 end of colistin treatment (D23). This experiment was approved by the ComEth
79 Anses/ENVA/UPEC n°16 (French ethical committee) under the reference APAFIS#2905-
80 2015112717486085.

81

82 *2.4. Microbiological analysis and colistin assay*

83 About 1 g of each fresh faecal sample was diluted in saline solution. Selected dilutions were
84 plated on Mac Conkey agar (BD, Le Pont de Claix, France) alone or supplemented with 200
85 mg/L of rifampicin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in order to count total *E. coli* and
86 ECmcr1+, respectively.

87

88 Another specimen (1 g of faeces) from D0 to D9 was kept at -20°C until colistin was assayed
89 by a LC-MS/MS method adapted from previous works [8, 9]. Briefly, faeces were mixed with
90 blank plasma and diluted in 10 mL of acetonitrile with 6% of trichloroacetic acid. After
91 vortexing, centrifugation and evaporation, dry matter was diluted in buffer (pH=7.2) with
92 blank plasma and loaded on Oasis HLB Catridges (Waters, Milford, MA, USA). After
93 washing and eluates evaporation, residues were analysed by HPLC-MS/MS with a limit of
94 quantification (LOQ) of 1 µg/g of faeces. Quality controls were prepared at 2.5, 12.5 and 18.8
95 µg/g of faeces.

96

97 *2.5. Statistical analysis*

98 Mean values of colistin faecal concentrations of the two treated groups were compared using
99 a Student-T test. Mean values of total faecal *E. coli* and of ECmcr1+ for treated groups were
100 compared to those of the placebo group using a Student-T test. All statistical analyses were
101 carried out using R 3.3.2 [10].

102

ACCEPTED MANUSCRIPT

103 **3. Results**

104 High faecal colistin concentrations were measured with mean values greater than or equal to
 105 about 200 µg/g of faeces from D2 to D5 in the two treated-groups (Table 1). No significant
 106 differences were observed between these groups (T-test) due to the high inter-individual

variability. Following administration of 200 µg/kg intramuscular colistin, the mean faecal colistin concentration was 200 µg/g.

107

Following oral administration of 500 mg/kg and 1000 mg/kg colistin, the mean faecal colistin concentration was 200 µg/g and 400 µg/g, respectively. No significant differences were observed between these groups (T-test).

Following intramuscular administration of 200 µg/kg colistin, the mean faecal colistin concentration was 200 µg/g. No significant differences were observed between these groups (T-test). Following oral administration of 500 mg/kg and 1000 mg/kg colistin, the mean faecal colistin concentration was 200 µg/g and 400 µg/g, respectively. No significant differences were observed between these groups (T-test).

108

After intramuscular administration of 200 µg/kg colistin, the mean faecal colistin concentration was 200 µg/g. No significant differences were observed between these groups (T-test). Following oral administration of 500 mg/kg and 1000 mg/kg colistin, the mean faecal colistin concentration was 200 µg/g and 400 µg/g, respectively. No significant differences were observed between these groups (T-test).

109

126 4. Discussion

127 To our knowledge, this is the first in vivo study exploring the selective effect of colistin on
 128 *mcr-1*-positive *E. coli* in pigs. Previous studies already attested a rare emergence of colistin-
 129 resistant *E. coli* after oral colistin treatment of healthy [7] and sick piglets [11], therefore we
 130 neglected it. Exogenous resistant bacteria inoculation in treated pigs already supported the
 131 selective effect of other antimicrobials in these animals [12]. In order to control the colistin
 132 doses, we chose to force-feed the piglets for treatment. The absence of significant differences
 133 of faecal colistin concentrations between HD and RD groups was likely due to measurement
 134 uncertainty. However, these results seemed relevant: with a daily faecal excretion of piglets of
 135 around 250 g [13], we can estimate that about 60 and 95 % of the colistin dose was recovered
 136 in faeces for HD and RD group. This is consistent with the poor absorption of colistin
 137 sulphate after oral treatments in pigs [5]. In addition, we chose to induce a rifampicin
 138 resistance in ECmcr1+ in order to monitor precisely this strain and due to the poor accuracy
 139 of colistin-supplemented media for resistant Enterobacteriaceae isolation [7, 11].

140

141 The initial decrease of EC_{tot} level before treatment and the slight continuous one of placebo
 142 group were probably due to the weaning process that disturbed the microbiota equilibrium

143 [14]. The high colistin treatment induced a significant reduction of EC_{tot} counts compared to
 144 the placebo group (Fig. 1A), but the recommended dose poor

ly affected it. Considering the

µg/g), greater reduction of *E.*

res could lead to a dramatic

o 90 % of the initial dose could

with a bioassay method and not

the placebo group (Fig. 1A), but the recommended dose poor

high faecal concentrations during the treatment phase (> 200

coli would be expected. Colistin high adsorption to faecal fib

decrease of its effect [15]. In addition, for polymyxin B, up to

be reversibly bound to faeces [16]. Although this was shown

151 of majority of colistin-sensitive strains ($\text{CMI} \leq 2 \text{ mg/L}$). Therefore, the absence of significant
152 difference of the EC_{tot} evolution between the two treated groups is still unclear. The small
153 number of animal per group is perhaps a limiting factor. Moreover, inter and intra-individual
154 variabilities of faecal colistin concentrations were high, probably due to a heterogeneous
155 colistin distribution within faeces. Therefore, the actual effective concentrations of colistin, to
156 which bacteria were exposed within the digestive tract, are mostly unknown.

157

158 In the placebo group, the counts of $\text{EC}_{\text{mcr1+}}$ were low but remained stable enough over the
159 experiment (Fig. 1B). No selective effect of colistin in treated piglets was observed as
160 $\text{EC}_{\text{mcr1+}}$ stayed at a constant level over time, whatever the dose. This suggests that, in
161 standardized conditions, bacteria were exposed during a too short period to concentrations
162 within the selection window, i.e. between the MICs of indigenous *E. coli* and of $\text{EC}_{\text{mcr1+}}$
163 (8 mg/L). In comparison, when colistin is administered on a large scale through water or feed
164 on pig farms, colistin concentration in faeces are lower [7] and much more variable [17];
165 therefore the probability to select strains harbouring *mcr-1* increases. Despite this, no real
166 outbreak of *mcr-1* positive strains exists in pig production in Europe [2] where a low
167 prevalence of *mcr-1* positive *E. coli* is found (e.g. 0.5 % in French pig farms) [4]. In contrast,
168 a high prevalence is observed in Asia (more than 20 % in China) [2], where colistin has been
169 used for decades as growth-promoter for piglets [18]. This sub-therapeutic dose (about 4-5
170 times lower than therapeutic use [19]) administered during a long period is likely to give
171 digestive concentrations reaching the selection window of *mcr-1* positive strains. Awareness
172 of this high risk led China to ban colistin as promoter very recently [20]. This hypothesis
173 should deserve further considerations.

174

175

176 **5. Conclusions**

177 In conclusion, under this experimental setting in piglets, oral dosing with colistin did not
178 induce selection of *mcr-1* positive strains. Further investigations should be necessary to
179 confirm this observation in farming conditions (with colistin given via food or water and
180 piglets having contact between them). Meanwhile, a responsible and careful use of colistin is
181 required to preserve this last-resort antimicrobial agent.

182

183 **Acknowledgments**

184 The authors would like to thank Jean-Guy Rolland and Mireille Bruneau, Anne De Courville,
185 Karine Deleurme, Pamela Houée, Catherine Poirier for their technical assistance.

186

187 **Declarations**

188 **Funding:** Alexis Viel was supported by a doctoral fellowship from the French National
189 Institute of Health and Medical Research (Inserm) and the French Agency for Food,
190 Environmental and Occupational Health & Safety (Anses).

191 **Competing Interests:** None

192 **Ethical Approval:** This experiment was approved by the ComEth Anses/ENVA/UPEC n°16
193 (French ethical committee) under the reference APAFIS#2905-2015112717486085

194

195

196

197 **References**

- 198 [1] Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-
199 mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a
200 microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016;16:161-
201 8.
- 202 [2] Skov R, Monnet D. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later,
203 the story unfolds. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles =*
204 *European communicable disease bulletin*. 2016;21:30155.
- 205 [3] Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union:
206 development of resistance and possible impact on human and animal health.: European
207 Medicines Agency (EMA); 2016.
- 208 [4] Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, et al.
209 Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014.
210 *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European*
211 *communicable disease bulletin*. 2016;21.
- 212 [5] Guyonnet J, Manco B, Baduel L, Kaltsatos V, Aliabadi M, Lees P. Determination of a
213 dosage regimen of colistin by pharmacokinetic/pharmacodynamic integration and modeling
214 for treatment of GIT disease in pigs. *Research in veterinary science*. 2010;88:307-14.
- 215 [6] Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, et al. Consistent Global
216 Approach on Reporting of Colistin Doses to Promote Safe and Effective Use. *Clinical*
217 *Infectious Diseases*. 2014;58:139-41.
- 218 [7] Fleury MA, Jouy E, Eono F, Cariolet R, Couet W, Gobin P, et al. Impact of two different
219 colistin dosing strategies on healthy piglet fecal microbiota. *Research in Veterinary Science*.
220 2016;107:152-60.

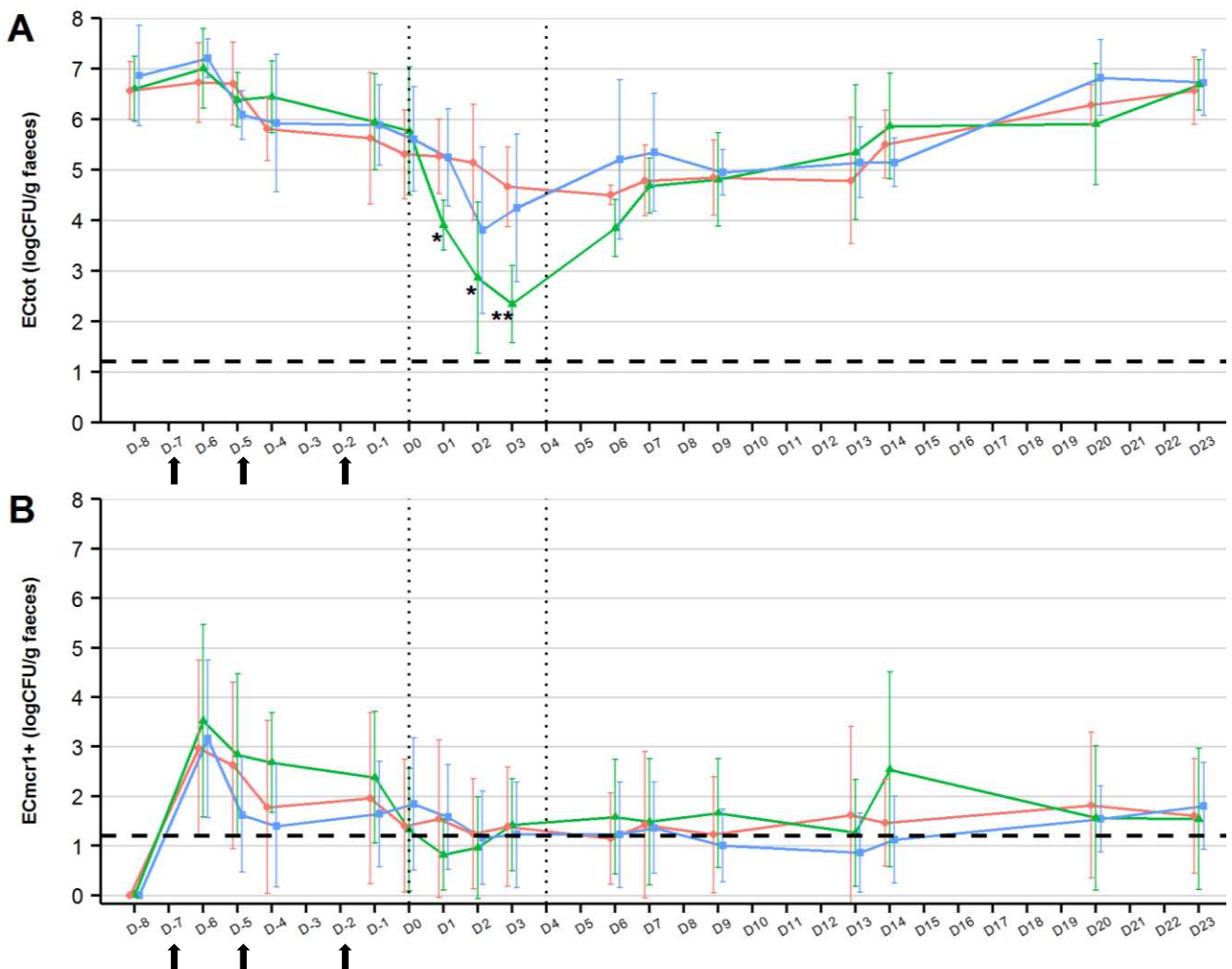
- 221 [8] Van den Meersche T, Van Pamel E, Van Poucke C, Herman L, Heyndrickx M, Rasschaert
222 G, et al. Development, validation and application of an ultra high performance liquid
223 chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous detection and
224 quantification of five different classes of veterinary antibiotics in swine manure. *Journal of*
225 *Chromatography A*. 2016;1429:248-57.
- 226 [9] Gobin P, Lemaitre F, Marchand S, Couet W, Olivier JC. Assay of colistin and colistin
227 methanesulfonate in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
228 *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54:1941.
- 229 [10] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation
230 for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2016.
- 231 [11] Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Bergeron N, Beauchamp G, Laurent-Lewandowski
232 S, et al. In vivo therapeutic efficacy and pharmacokinetics of colistin sulfate in an
233 experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *Veterinary*
234 *Research*. 2016;47:58.
- 235 [12] Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM, Guardabassi L. Selection and Persistence of CTX-
236 M-Producing *Escherichia coli* in the Intestinal Flora of Pigs Treated with Amoxicillin,
237 Cefotiofur, or Cefquinome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52:3612-6.
- 238 [13] Pouliot F, Godbout S, Dufour V, Vob Bernuth R, Hill J. Évaluation de l'efficacité d'un
239 système de séparation fèces-urine sous caillebotis en engraissement: bilan de masse et
240 caractérisation des sous-produits. *Journées Rech Porcine*. 2005;37:45-50.
- 241 [14] Swords WE, Wu C-C, Champlin FR, Buddington RK. Postnatal changes in selected
242 bacterial groups of the pig colonic microflora. *Neonatology*. 1993;63:191-200.
- 243 [15] Van Saene JJ, Van Saene HK, Stoutenbeek CP, Lerk CF. Influence of faeces on the
244 activity of antimicrobial agents used for decontamination of the alimentary canal.
245 *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1985;17:295-300.

- 246 [16] Hazenberg M, Pennock-Schröder A, Van de Merwe J. Reversible binding of polymyxin
247 B and neomycin to the solid part of faeces. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
248 1986;17:333-9.
- 249 [17] Soraci AL, Amanto F, Tapia MO, de la Torre E, Toutain P-L. Exposure variability of
250 fosfomycin administered to pigs in food or water: impact of social rank. *Research in*
251 *veterinary science*. 2014;96:153-9.
- 252 [18] Kim DP, Saegerman C, Douny C, Dinh TV, Xuan BH, Vu BD, et al. First survey on the
253 use of antibiotics in pig and poultry production in the Red River Delta region of Vietnam.
254 *Food and Public Health*. 2013;3:247-56.
- 255 [19] Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this
256 antibiotic in pig production? *International journal of antimicrobial agents*. 2016;48:119-26.
- 257 [20] Walsh TR, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet*
258 *Infectious Diseases*. 2016;16:1102-3.

259

ACCEPTED MANUSCRIPT

Fig 1: Mean ($\pm$ SD) of counts of total faecal *E. coli* (A) and *ECmcr1+* (B) before, during and after oral colistin (or water) administrations for HD group (green), RD group (blue) and placebo group (red). Vertical arrows indicate *ECmcr1+* inoculations. The vertical dotted lines indicate the treatment period (D0 to D4). Horizontal dashed line represents the limit of quantification (log 1.2) and data below this value were arbitrary put to value log 0.6. Similar profiles were obtained when data below LOQ were fixed at zero or at LOQ. Significant differences from placebo group with Student test: * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)



ACCEPTED MANUSCRIPT

268 TABLE 1: Faecal colistin concentrations over time in each treated-group^a.

Treatment Group	Mean $\pm$ SD (and range) in μg of colistin base/g of faeces per day.								
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D9
Recommended Dose (100,000 UI/kg/day)	0	93.2 $\pm$ 56.0 (28.1 - 149.9)	193.6 $\pm$ 144.5 (75.5 - 381.5)	217.4 $\pm$ 103.3 (74.2 - 327.0)	197.1 $\pm$ 54.7 (128.9 - 261.2)	262.5 $\pm$ 57.8 (212.4 - 342.1)	42.3 $\pm$ 22.8 (14.9 - 72.0)	1.8 $\pm$ 0.3 (1.6 - 2.2)	< LOQ ^b
High Dose (200,000 UI/kg/day)	0	119.6 $\pm$ 55.2 (61.2 - 188.9)	267.9 $\pm$ 78.3 (169.7 - 354.6)	268.9 $\pm$ 119.2 (155.0 - 470.9)	373.4 $\pm$ 190.2 (141.6 - 669.5)	249.7 $\pm$ 109.1 (106.3 - 372.4)	80.3 $\pm$ 103.8 (15.0 - 264.8)	3.4 $\pm$ 1.6 (1.7 - 5.7)	< LOQ ^b

^a Placebo group is not mentioned as all concentrations were null^b LOQ: 1 μg /g of faeces

269

5.1.4. Discussion/ Perspectives

Cette étude a montré que dans nos conditions expérimentales chez le porc (gavage de colistine), la souche ECmcr1+ n'a pas été sélectionnée. Ce résultat est important car il implique que la pression de sélection de la colistine en élevage ne serait pas suffisante pour faire proliférer les souches hébergeant mcr-1 chez le porcelet traité. Cependant, ce résultat n'est probablement pas généralisable à toutes les souches d'E. coli, ni toutes les espèces bactériennes.

Plusieurs aspects de cette étude peuvent être discutés. Le suivi de ECmcr1+ s'est fait grâce à la résistance à la rifampicine qui a été induite et non par suivi direct de la résistance à la colistine. Cette méthode peut révéler des faux positifs, à savoir des bactéries qui seraient toujours résistante à la rifampicine mais auraient perdu leur plasmide portant le gène mcr-1, et donc surestimer les résultats de dénombrements. Cependant, au vu des résultats obtenus, une surestimation impliquerait des quantités de ECmcr1+ encore plus faible et donc confirmerait une absence de sélection comme déjà expliqué. En outre, l'induction de la résistance à la rifampicine a pu induire un coût biologique à ECmcr1+ et donc diminuer la capacité de cette souche à coloniser l'intestin et proliférer (Cavaco et al., 2008).

De nouveaux milieux permettant de discriminer de façon efficace les Entérobactéries résistantes à la colistine ont récemment été publiés (Abdul Momin et al., 2017; Nordmann et al., 2016), et pourraient permettre de s'affranchir de l'induction d'une autre résistance pour suivre les souches inoculées. Ces milieux sont également intéressants pour détecter l'émergence de résistance à la colistine (par mutation), ce qui n'a pu être effectué dans notre étude. Cependant, l'émergence de souche col-R semble rare comme l'ont montré de précédentes études in vivo chez le porc sain et malade (Fleury et al., 2016; Rhouma et al., 2016b).

Enfin, il n'a pas été possible de suivre un éventuel transfert de mcr-1 entre la souche inoculée et les bactéries endogènes des porcelets. Dans la littérature, les transferts de plasmides portant mcr-1 ont été mesurés à des niveaux très variables, allant de 10^{-10} à 10^{-1} (Yang et al., 2017) mais il est supposé que pour la majorité des Entérobactéries, ces transferts se font à des taux entre 10^{-6} et 10^{-4} (Denervaud Tendon et al., 2017). Cependant, nos essais de conjugaisons in vitro en milieu liquide ont échoué à montrer un transfert du gène mcr-1 entre la souche ECmcr1+ et une souche E. coli receveuse. D'autres méthodes pourraient être testées comme la conjugaison en milieu solide afin de confirmer ces résultats. En outre, ces résultats ne préjugent

pas de la possibilité de transferts in vivo. Chez l'Homme, une étude a déjà démontré l'existence d'un phénomène de conjugaison in vivo d'un gène de résistance à la vancomycine dans l'intestin, entre des souches d'*Enterococcus*. En administrant par voie orale à la fois la souche donneuse porteuse du gène (qui aurait été ECmcr1+ dans notre cas) et une souche receveuse (non endogène), des transconjugants ont ainsi pu être détectés dans les fèces (Lester et al., 2006). Ce type de protocole pourrait être à l'avenir testé avec des porcs.

Cette étude confirme également que le traitement à la colistine peut diminuer fortement la population de *E. coli* endogènes pendant le traitement mais que la recolonisation est rapide, comme précédemment observé (Fleury et al., 2016 ; Rhouma et al., 2016b). Cette recolonisation peut se faire à partir des *E. coli* restants dans le tube digestif mais aussi par des souches exogènes, retrouvées dans l'environnement. C'est peut-être pendant cette phase critique que des animaux non porteurs de souche positive pour mcr-1 peuvent être colonisés par des souches porteuses de mcr-1 en provenance d'autres animaux en contact. L'éventuelle diffusion de la souche ECmcr1+ entre animaux n'a pas pu être évaluée dans notre étude mais représente un axe de recherche à poursuivre.

5.2. Traitement à la colistine par voie orale chez le rat hébergeant un microbiote intestinal humain porteur d'un *E. coli* positif pour *mcr-1*

5.2.1. Introduction

Comme expliqué précédemment (cf. 2.4.4), l'usage de la colistine dans le protocole de décontamination sélective digestive (SDD) en médecine humaine est sujet à controverse. Son efficacité en termes de diminution de la mortalité et des infections nosocomiales semble démontrée mais ses effets sur le développement de l'antibiorésistance font débat. En outre, aucune étude n'a été publiée sur l'impact d'un tel traitement dans le contexte de la découverte du gène *mcr-1*.

L'objectif général de cette étude a été d'évaluer l'effet d'un traitement à la colistine de type SDD sur la sélection d'un *E. coli* positif pour *mcr-1* dans un modèle animal expérimental mimant l'exposition du microbiote humain dans le tube digestif. Le rat axénique hébergeant un microbiote intestinal humain a été utilisé car ce type de modèle se rapproche plus de l'Homme que les modèles avec des rongeurs hébergeant une flore conventionnelle (Hirayama and Itoh, 2005; Yi and Li, 2012).

Ainsi, trois étapes principales ont été suivies :

1. Obtenir un modèle de rats hébergeant un microbiote intestinal humain contenant la souche *E. coli* résistante à la colistine en sous-dominance vis-à-vis de la population des *E. coli* intestinaux totaux.
2. Définir la dose de colistine optimale mimant un protocole de SDD chez le rat et obtenir des informations sur la cinétique fécale de la colistine.
3. Et enfin, étudier l'effet sélectif de la colistine sur la souche porteuse du gène *mcr-1*.

Les travaux présentés ci-dessous regroupent les expérimentations qui ont pu être menées sur ce sujet lors de la thèse et sont considérés comme des travaux préliminaires vis-à-vis de l'objectif général.

5.2.2. Matériels et méthodes

Cette partie décrit le « matériels et méthodes » général utilisé sur l'ensemble de l'étude concernant les animaux, la souche bactérienne et les méthodes microbiologiques.

Ensuite, pour chacune des 3 étapes précédemment évoquées, les protocoles spécifiques utilisées seront détaillés dans 3 sections distinctes de la partie 5.2.3.

5.2.2.1. Animaux

Des rats axéniques Fisher d'environ 200g à leur arrivée et provenant de l'INRA ont été utilisés. Seuls des mâles ont été sélectionnés en raison de leur comportement plus docile. Les rats ont été nourris avec des granulés stériles et abreuvés avec de l'eau stérile, de façon ad libitum. Ils étaient hébergés de façon individuelle dans des cages, à l'intérieur d'isolateurs stériles. Afin de limiter l'influence du comportement coprophage des rats sur les résultats, ceux-ci étaient hébergés sur une grille laissant passer les fèces.

En outre des essais sur des rats conventionnels Sprague-Dawley (fournis par Janvier Labs) ont permis d'optimiser la dose de colistine et obtenir des informations sur la cinétique fécale de colistine. Ces rats étaient hébergés de façon individuelle dans des cages, avec granulés et eau à volonté, et placés également sur des grilles afin de limiter la coprophagie.

Une période d'acclimatation de 5 jours pour chaque animal a été respectée avant le début des expérimentations. L'ensemble des expérimentations a été validé par le Comité d'éthique local sous la référence 2905-2015112717486085.

5.2.2.2. Souche bactérienne et analyses bactériologiques

La souche utilisée pour l'étude sur le porcelet (ECmcr1+, cf. 5.1) a été conservée pour cette étude. Brièvement, cette souche non pathogène était porteuse d'une résistance chromosomique à la rifampicine et d'une résistance plasmidique à la colistine (*mcr-1*).

Le suivi des *E. coli* totales (notées ECtot) et de ECmcr1+ s'est fait grâce à des prélèvements réguliers individuels de fèces fraîches (par stimulation anale) et des dénombrements bactériens à partir de ces échantillons.

Afin de pouvoir suivre dans le temps l'évolution de la souche ECmcr1+ à partir des prélèvements de fèces, deux types de milieu ont été utilisés et comparés :

- la gélose Mc Conkey supplémentée avec de la rifampicine (200 mg/mL). Les souches qui poussent sur ce milieu (notées EC Rif-R) sont censées être exclusivement la souche ECmcr1+. Cependant, une éventuelle perte de *mcr-1* ne peut être appréhendée par ce milieu (risque de faux-positif).
- le milieu nommé SuperPolymyxin (Nordmann et al., 2016) pouvant discriminer spécifiquement les BGN col-R, dont les *E. coli* (notées EC col-R) sans distinction du mécanisme de résistance. Ce milieu est composé d'une gélose Eosin méthylène Blue (EMB) contenant de la daptomycine pour inhiber les bactéries Gram positif, de l'amphotéricine pour inhiber les champignons et de la colistine à 3,5 mg/L pour sélectionner les souches dont la CMI à la colistine est supérieure à 2 mg/L. Ce milieu a déjà été validé avec des échantillons fécaux (Nordmann et al., 2016).

Brièvement, chaque prélèvement de fèces d'environ 200 mg a été broyé puis dilué dans du sérum physiologique, et les dilutions ciblées ont été étalées sur des géloses contenant de la rifampicine (LOD =50 UFC/g de fèces) ou sur des géloses SuperPolymyxin (LOD =500 UFC/g de fèces).

5.2.2.3. Microbiote intestinal humain et inoculation aux rats

L'implantation d'un microbiote intestinal humain aux rats s'est fait grâce à un don de matières fécales provenant de volontaires sains, n'ayant eu aucun traitement antibiotique durant les 6 derniers mois. Le choix du donneur a été effectué sur la base des résultats d'analyses bactériologiques (par culture) et par comparaison des niveaux de population bactérienne (cultivable) avec ceux issus de la littérature (Furet et al., 2009; Rowland et al., 1985; Salminen et al., 1995). Le détail des géloses utilisées est résumé dans le Tableau S2 (en Annexe) et les résultats de la quantification du donneur final sont donnés dans la Figure S1 (en Annexe).

Concernant l'inoculation du microbiote intestinal humain aux rats axéniques, celle-ci s'est déroulée à partir de matières fécales fraîches provenant du donneur sélectionné, récoltées dans un pot stérile et gardées sous atmosphère anaérobie grâce à un générateur d'anaérobiose (GENbox anaer, Biomérieux). L'échantillon transféré ensuite en chambre anaérobie, a été dilué au 10^e et homogénéisé dans du bouillon au thioglycolate avec résazurine (Biomérieux). Ensuite, 1 mL de cette suspension fécale a été administrée à chaque rat (en isolateur) par gavage avec une canule.

5.2.3. Résultats

5.2.3.1. Etape 1 : Détermination du schéma optimal d'implantation du microbiote intestinal humain contenant la souche ECmcr1+

- Objectif :

L'objectif était d'avoir un modèle de rat hébergeant une flore humaine contenant une souche *E. coli* porteuse de *mcr-1* en sous-dominance par rapport à l'ensemble des *E. coli*. Ainsi, il a été nécessaire d'optimiser la taille de l'inoculum à administrer.

- Protocole :

Plusieurs scénarii d'inoculation ont été testés :

- A. **Administration simultanée** d'un **fort inoculum** ($\sim 10^8$ UFC/mL) de ECmcr1+ avec le microbiote intestinal humain (n=3 rats)
- B. **Administration simultanée** d'un **inoculum moyen** ($\sim 10^5$ UFC/mL) de ECmcr1+ avec le microbiote intestinal humain (n=4 rats)
- C. **Administration simultanée** d'un **faible inoculum** ($\sim 10^3$ UFC/mL) de ECmcr1+ avec le microbiote intestinal humain (n=3 rats)
- D. **Administration décalée** : d'abord le microbiote intestinal humain, puis, après stabilisation de cette flore (19 jours), inoculation d'un **fort inoculum** ($\sim 10^8$ UFC/mL) de ECmcr1+ (n=3 rats).

Des prélèvements réguliers de fèces ont été réalisés de façon individuelle afin de dénombrer la souche ECmcr1+ et suivre son évolution au cours du temps en parallèle de la population *E. coli* totale (ECtot).

- Résultats :

Les résultats des dénombrements bactériens sont montrés sur la Figure 19. L'administration décalée de la souche ECmcr1+ entraîne la présence transitoire de la souche au sein du microbiote fécal des rats (Figure 19D). L'effet barrière de la flore humaine préalablement implantée est probablement trop important pour permettre à la souche ECmcr1+ de s'y installer.

Si la souche est administrée simultanément à la flore fécale, elle s'implante à des niveaux de concentration dépendants de la taille de l'inoculum de départ. Lorsque l'inoculum est fort, ECmcr1+ apparaît dans la flore fécale des rats à des niveaux de concentration équivalents, voire supérieurs aux autres *E. coli* endogènes. Ainsi, les *E. coli* endogènes de la flore, sensibles à la colistine, ne pouvant être différenciés des *E. coli* résistants, ce schéma d'inoculation pour l'étude n'a pas été retenu (Figure 19A). Le faible inoculum n'a donné qu'une présence transitoire de ECmcr1+ (indétectable au bout de 5 jours) (Figure 19C). Enfin l'inoculum moyen s'est avéré être le meilleur pour obtenir la souche ECmcr1+ en sous-dominance parmi les *E. coli* totaux (Figure 19B), ce qui correspondait au modèle attendu. Il faut noter cependant que pour l'un des 4 rats de ce groupe, la souche ECmcr1+ est devenue dominante au bout de quelques jours (à l'instar du groupe A) et ce rat a donc été exclu des résultats (non pris en compte dans le graphe). Cela souligne que la variabilité biologique inter-individuelle inhérente à ce type de procédure expérimentale n'est pas négligeable, ce qui a des conséquences sur le nombre minimal d'animaux par groupe à utiliser.

Concernant la comparaison des deux types de géloses utilisées, les dénombrements bactériens ont donné des résultats comparables chez les groupes de rats où la distinction entre population *E. coli* sensibles et résistantes était possible (Figure 19B et C). Ceci suggère que la souche résistante à la colistine majoritaire dans les fèces est bien la souche ECmcr1+ qui a été inoculée.

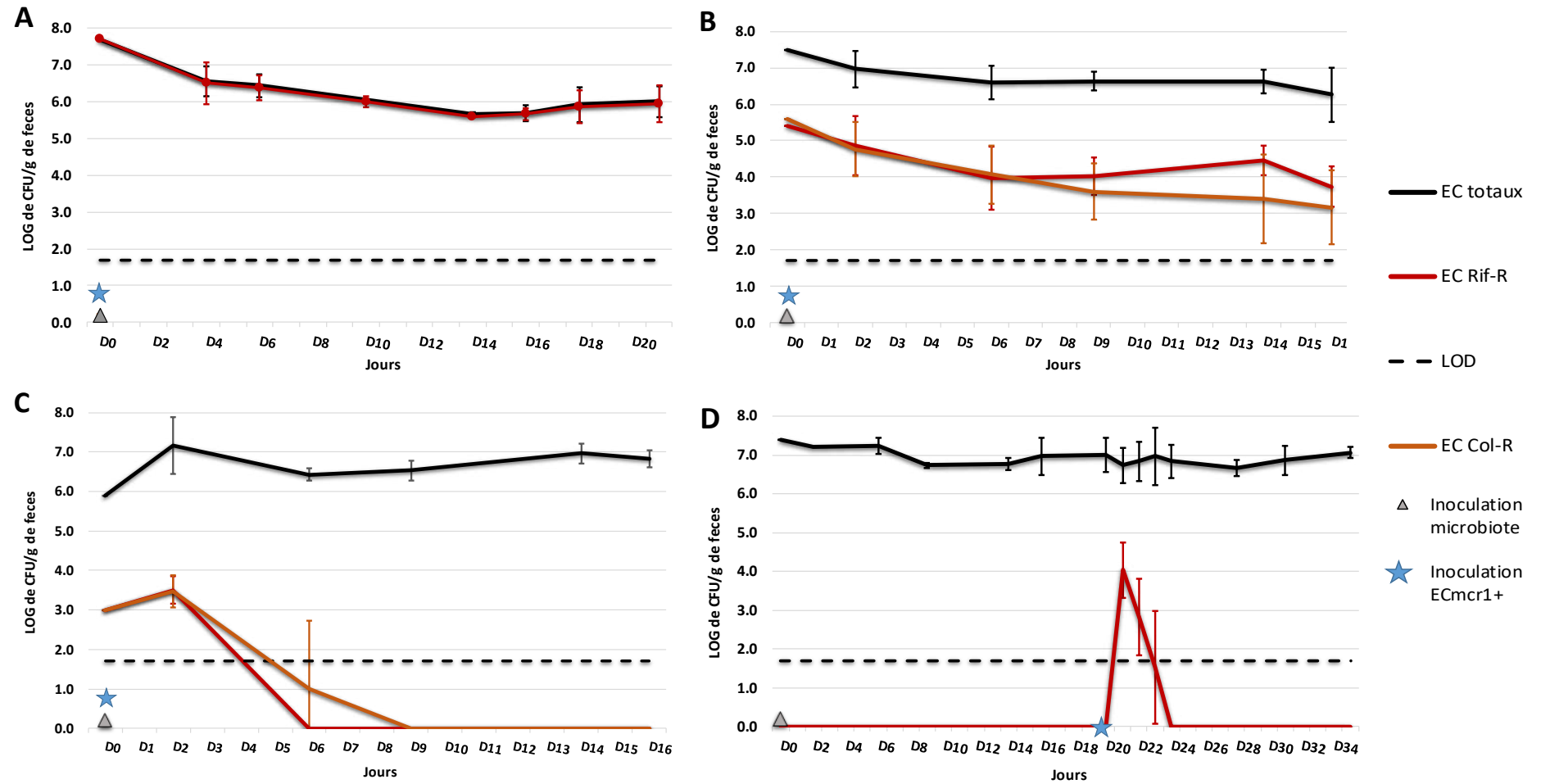


Figure 19 : Evolution de la population totale de *E. coli* et de la souche ECmcr1+ en fonction du schéma d'inoculation.

Protocoles : administrations simultanées du microbiote et de ECmcr1+ à un fort (10^8 UFC/mL, A), moyen (10^5 UFC/mL, B, et faible inoculum (10^3 UFC/mL, C).

Administration décalée (D19) de ECmcr1+ (10^8 UFC/mL, D). D0 correspond à l'inoculation de la flore intestinale humaine.

Sur chacune des figures, le 1^{er} point correspond à la quantification de l'inoculum. Pour les groupe A et D, la gélose SuperPolymyxin n'a pas été utilisée.

Ectot : *E. coli* totaux ; EC col-R : *E. coli* résistant à la colistine ; EC Rif-R : *E. coli* résistant à la rifampicine (ECmcr1+) ; LOD : limite de détection

5.2.3.2. Etape 2 : Détermination de la dose de colistine à utiliser chez le rat pour mimer un traitement type SDD et cinétique fécale de colistine

- Objectif :

La dose de colistine à utiliser chez le rat pour mimer un protocole de SDD a été optimisée en réalisant un suivi des *E. coli* totaux fécaux (ECtot) chez des rats conventionnels. Une diminution significative de cette population a été considérée comme l'objectif à atteindre. En outre, une cinétique fécale de colistine a été réalisée en parallèle.

- Protocole :

La dose classique de colistine sulfate utilisée en SDD chez l'adulte est de 400 mg CBA/jr (en 4 administrations), quel que soit le poids (Sarginson et al., 2011). Pour un homme standard de 70 kg, cette dose correspond à environ 5,7 mg CBA/kg/jr de colistine.

Pour extrapoler aux rats, plusieurs doses ont été testées :

- la dose de colistine par kg chez l'Homme ramenée au poids standard du **rat (dose faible, n=5)**. Ainsi, pour un rat standard de 250 g une dose journalière de 1,4 mg CBA a été administrée.
- une dose triple de la dose précédente a testée (4,2 mg CBA/jr, **dose forte, n=3**). La justification repose sur une publication qui a montré que l'extrapolation de l'Homme à la souris nécessite de tripler la dose, probablement en raison de la masse relative des intestins plus importante chez les rongeurs par rapport à l'Homme (Speekenbrink et al., 1987).
- une **dose intermédiaire** entre les deux doses précédentes a également été testée (2,2 mg CBA/jr, n=3).

La dose journalière a été donnée par gavage (1 mL par administration) en 2 fois espacées de 6 h (matin et après-midi) pendant 3 jours.

Des prélèvements de fèces réguliers ont été effectués (par stimulation anale) afin de dénombrer les *E. coli* totaux sur gélose Mc Conkey et ainsi comparer l'efficacité du traitement à la colistine selon la dose administrée pour « décontaminer » le tube digestif.

Une cinétique fécale de colistine a également été réalisée, seulement pour le groupe dose faible, afin d'avoir un aperçu des concentrations fécales obtenues, mais également pour évaluer si la sensibilité de la méthode de dosage de la colistine dans les fèces était suffisante. Les prélèvements fécaux ont été réalisés à partir du 1^{er} jour de traitement et jusque 5 jours après (soit 48h après la dernière dose). Pendant la phase de traitement (3 jours), la répartition des prélèvements a été faite de la façon suivante :

- ❖ 11 échantillons entre 1 et 2 h après une administration
- ❖ 9 échantillons entre 2 et 4,5 h après une administration
- ❖ 12 échantillons entre 16 et 17,5 h après une administration

Puis à la fin du traitement :

- ❖ 3 échantillons environ 25 h après la dernière administration
- ❖ 5 échantillons environ 40 h après la dernière administration
- ❖ 3 échantillons environ 49 h après la dernière administration

Les dosages de colistine dans les fèces ont été réalisés par HPLC-MS/MS, en suivant la même méthodologie que pour les fèces de porc (cf. 5.1.3) avec une limite de quantification à 0,125 µg/g de fèces.

- Résultats :

Les résultats des dénombrements de EC_{tot} dans les fèces des rats en fonction de la dose de colistine utilisée sont présentés dans la Figure 20. Ni la dose standard de l'Homme extrapolée au poids du rat (dose faible), ni la dose intermédiaire n'ont été efficaces pour diminuer de façon significative la population d'*E. coli*. Malgré la variabilité assez forte, la dose forte a permis une chute moyenne de 3 log dans les quantités de *E. coli* totaux. Sachant que ce traitement a été réalisé sur une période courte (3 jours) et avec seulement 2 administrations par jour (au lieu de 4 chez l'Homme), il a été considéré que cette dose est efficace pour mimer une décontamination

digestive. Aucun effet secondaire majeur n'a été observé pendant cette phase, hormis l'obtention de selles plus molles pendant le traitement.

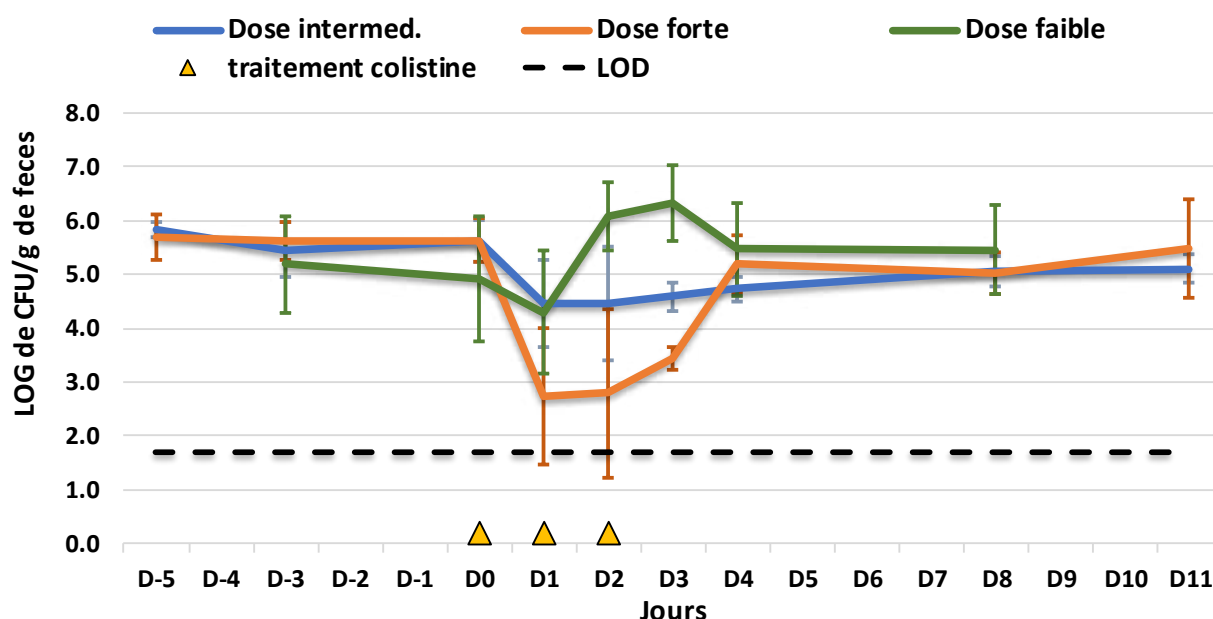


Figure 20 : Suivi des ECtot dans les fèces en fonction de la dose de colistine utilisée.

Dose forte : 4,2 mg CBA/jr ; Dose intermédiaire : 2,2 mg CBA/jr ; Dose faible : 1,4 mg CBA/jr

D0 correspond au 1^{er} jour de traitement à la colistine. LOD : limite de détection

Concernant la cinétique fécale de colistine, les résultats sont présentés dans la Figure 21. Les données obtenues montrent une variabilité intra et inter-individuelle importante. Les concentrations maximales ($\sim 100 \mu\text{g/g}$) ont été mesurées entre 1 et 2h après une administration de colistine, mais la variabilité est forte avec une étendue des concentrations de 1,4 à $165 \mu\text{g/g}$ de fèces. Environ 16h après une administration, les concentrations restent élevées mais toujours associées à une forte variabilité (entre 0,8 et $17 \mu\text{g/g}$). Deux jours après la fin du traitement, certains prélèvements avaient des concentrations en colistine encore supérieures à la LOQ.

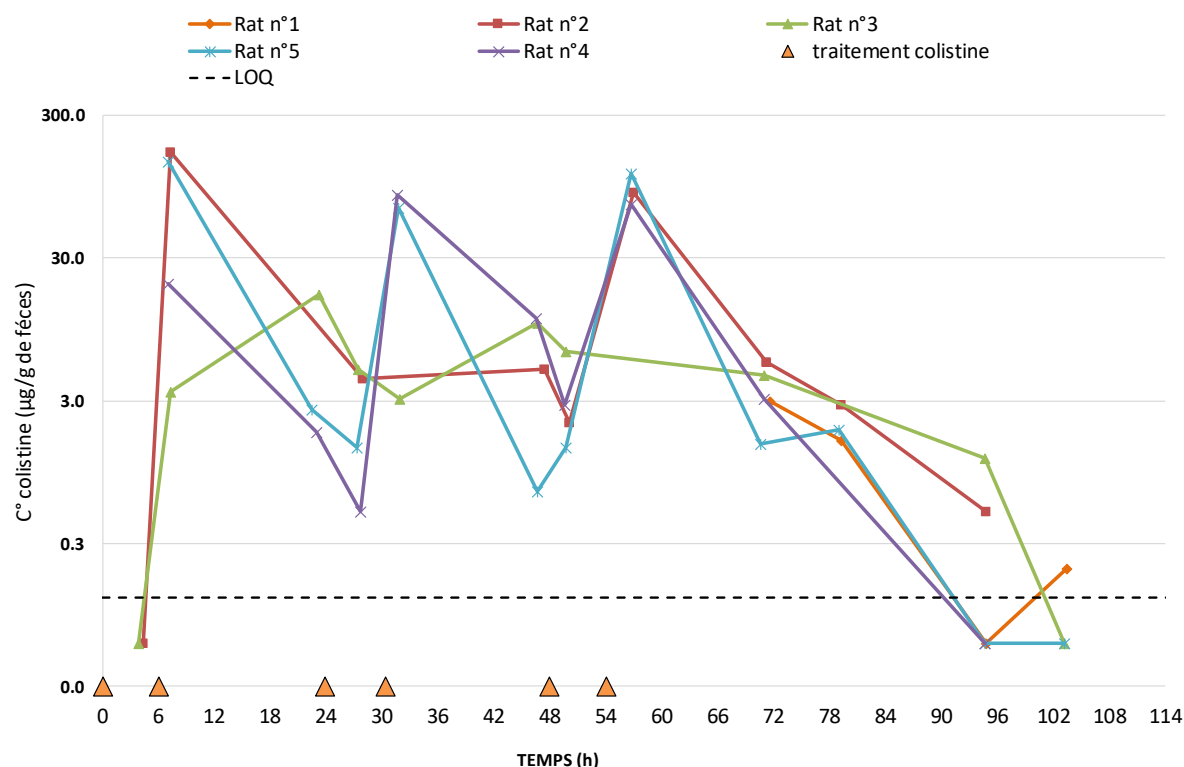


Figure 21 : Cinétique individuelle fécale de la colistine chez les 5 rats après 3 jours de traitement à la dose faible.

Les concentrations sous la limite de quantification (LOQ) ont été fixées à la moitié de la LOQ sur le graphique. Le rat n°1 n'a eu des prélèvements qu'après la fin du traitement.

5.2.3.3. Etape 3 : Impact d'un traitement colistine (type SDD) sur la sélection de ECmcr1+

- Objectif :

Après obtention du modèle animal expérimental désiré et optimisation de la dose de colistine à utiliser, l'effet d'un traitement à la colistine sur la sélection de ECmcr1+ a été évalué par un suivi de cette population dans les fèces.

- Protocole :

Les 3 rats ayant une population ECmcr1+ en sous-dominance utilisés lors de l'optimisation de ECmcr1+ (cf. 5.2.3.1, Figure 19 B) ont été réutilisés dans cette expérimentation. Ces

animaux ont été traités avec de la colistine sulfate à la dose journalière optimisée (cf. 5.2.3.2), soit 4,2 mg CBA/jr et administrée en 3 gavages par jour espacés de 6h.

Des prélèvements réguliers de fèces ont été réalisés de façon individuelle afin de dénombrer la souche ECmcr1+ (avec les deux milieux de culture précisés au 5.2.2.2) et suivre son évolution au cours du temps en parallèle de la population totale *E. coli* (ECTot).

- Résultats :

La Figure 22 détaille le suivi des populations bactériennes *E. coli* au cours du temps. On peut observer que la souche ECmcr1+ subit une sélection transitoire pendant le traitement à la colistine (D0 à D4). En effet, avant traitement, le ratio du nombre de ECmcr1+ sur le nombre de ECTot était d'environ 500. Pendant, la phase de traitement, ce ratio s'est approché de 1, illustrant le fait que la souche ECmcr1+ a pu être dominante pendant ce laps de temps. Cependant, cette sélection semble transitoire car en période de post-traitement, les niveaux des populations bactériennes sont revenus à des niveaux comparables à la phase de pré-traitement, avec ECmcr1+ en sous-dominance.

Les résultats de dénombrements sur gélose avec rifampicine et avec la gélose SuperPolymyxin ont donné des résultats comparables, soulignant le fait que, là encore, la souche ECmcr1+ était la seule souche d'entérobactérie résistante à la colistine dénombrable.

Enfin, ces résultats confirment que la posologie de colistine utilisée est efficace pour mimer un effet de type SDD. Pendant la phase de traitement, la population ECTot a diminué de façon importante, passant en moyenne de 6,8 log/g de fèces en début de traitement (D0) à 3,6 log/ g de fèces à la fin du traitement (D4). La diminution des *E. coli* sensibles a peut-être été encore plus importante mais ceci a été « masqué » par la présence des ECmcr1+.

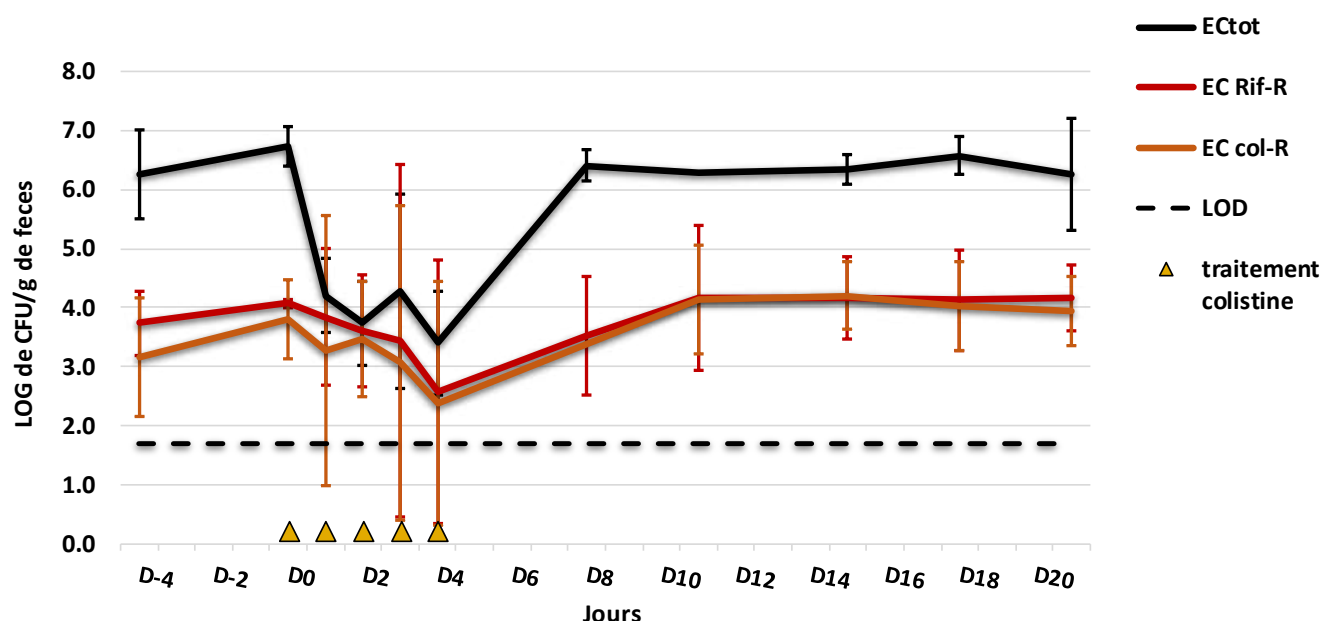


Figure 22 : Evolution de la population totale *E. coli* et de la souche *ECmcr1+* lors d'un traitement à la colistine.

L'implantation du microbiote contenant *ECmcr1+* a eu lieu 20 jours avant le début du traitement (D0). *ECtot* : *E. coli* totaux ; *EC col-R* : *E. coli* résistant à la colistine ; *EC Rif-R* : *E. coli* résistant à la rifampicine (*ECmcr1+*) ; LOD : limite de détection

5.2.4. Discussion/ Perspectives

Cette étude expérimentale a permis de mettre en place un modèle de rats hébergeant un microbiote intestinal humain avec présence d'une souche *E. coli* porteuse de *mcr-1* en sous-dominance. Même si la flore implantée dans ce modèle animal ne mime pas de façon complètement fidèle la diversité du microbiote intestinal humain (Silley, 2009), ce modèle permet de représenter le cas de patients étant traités à la colistine par voie orale et ayant un portage sain d'une souche *col-R* dans leur microbiote. La posologie de colistine utilisée a été adaptée chez le rat pour mimer une décontamination digestive, parfois utilisée dans certaines unités de soins intensifs comme traitement prophylactique (Bastin and Ryanna, 2009). Ces résultats ont montré que de telles doses permettent une diminution drastique de la population totale de *E. coli* (majoritairement sensible) mais que l'impact sur la souche *ECmcr1+* est limité, amenant à un phénomène de sélection transitoire. En effet, malgré la diminution significative de la population d'*E. coli* endogène (*ECtot*), la souche *ECmcr1+* n'est pas devenue dominante mais est restée à un niveau similaire à celui d'avant traitement (en sous-dominance). Les résultats de cinétique fécale de colistine ont souligné que les concentrations mesurées peuvent atteindre de fortes

valeurs ($> 100 \mu\text{g/g}$ de fèces, à la dose faible), ce qui implique que les concentrations intestinales devraient être suffisantes pour tuer la souche ECmcr1+ dont la CMI à la colistine est de $8 \mu\text{g/mL}$. Cependant, comme pour les résultats de cinétique fécale chez le porc, l'existence de liaisons non-spécifiques de la colistine aux fèces pourrait diminuer drastiquement la fraction libre pharmacologiquement active (Van Saene et al., 1985). Cette cinétique a également montré que l'élimination complète de colistine est assez lente (concentrations encore mesurables 2 jours après l'arrêt du traitement) malgré un transit digestif rapide chez le rat pour les liquides (Quini et al., 2012), ce qui pourrait également être en faveur d'une adsorption de la colistine sur les parois du tube digestif.

Ainsi, ces résultats attestent que : (i) cette dose de colistine n'est pas suffisante pour éliminer la souche col-R mais (ii) qu'elle n'exerce pas une pression de sélection suffisante pour faire proliférer la souche ECmcr1+. Cependant, dans cette étude, une souche non-pathogène a été utilisée. Dans le cas inverse, la baisse de la population *E. coli* totale pourrait diminuer suffisamment les effets de barrières de la flore endogène de telle sorte qu'une souche pathogène virulente (et résistante) pourrait proliférer. Néanmoins, dans le protocole classique de SDD en médecine humaine, une tri-thérapie d'antibiotiques est utilisée avec notamment un aminoside (tobramycine essentiellement) (van der Voort and van Saene, 2008) dont l'effet antibactérien peut se combiner avec celui de la colistine et potentiellement éliminer les souches col-R.

A l'instar de l'étude précédente chez le porc (cf. 5.1), le transfert du gène *mcr-1* entre les souches n'a pu être suivi en raison de la méthode d'analyse microbiologique utilisée. Nos essais *in vitro* de conjugaison du gène *mcr-1* de ECmcr1+ n'ont pas montré l'existence d'un tel transfert, même s'il n'est pas possible de préjuger de ce phénomène *in vivo*. Enfin, le phénomène d'émergence, plutôt que de sélection, de résistance à la colistine (mutation chromosomique) n'a pas été étudié, en raison de la présence de la souche ECmcr1+ qui « masque » l'isolement de telles souches mutées sur un milieu sélectif, comme le SuperPolymyxin.

Les perspectives liées à ce travail reposent sur la confirmation de ces résultats préliminaires, à la fois sur un nombre de rats plus important mais aussi en comparant des groupes traités avec colistine seul, avec la posologie complète de SDD (colistine, tobramycine et amphotéricine B) et avec un groupe placebo.

6. Modélisation PBPK du CMS et de la colistine par voie systémique

6.1. Modèle PBPK chez le porc : distribution rénale et application à l'estimation des temps d'attente

6.1.1. Introduction

L'usage du CMS par voie systémique est la voie d'administration la plus courante en médecine humaine, aboutissant à la formation *in vivo* de colistine. Les processus inhérents à l'ADME du CMS et de la colistine sont complexes et encore peu connus. Le recours à la modélisation PBPK permet d'explorer ces processus d'un point de vue mécanistique et ainsi mieux comprendre la distribution tissulaire de ces composés. Un modèle « whole body » PBPK couplé à une approche de population de type non-linéaire à effet mixte (NLME) a déjà été développé pour le CMS et la colistine chez le rat (Bouchene, 2016). L'objectif a été d'améliorer ce modèle en utilisant des données expérimentales supplémentaires chez le porc, notamment au niveau rénal.

Le porc a été choisi comme espèce cible de la modélisation PBPK en raison de sa proximité physiologique avec l'Homme, permettant des extrapolations inter-espèces ultérieures (cf. 6.2). En outre, le CMS est parfois utilisé par voie systémique en production porcine, ce qui donne lieu à l'application de temps d'attente avant commercialisation des denrées issues de ces animaux. Ainsi, comme application de notre modèle PBPK, une estimation de ces temps d'attente est également présentée dans cette partie.

6.1.2. Article

Ce travail a été soumis au journal *Pharmaceutical Research*.

A population WB-PBPK model of colistin and its prodrug CMS in pigs: focus on the renal distribution and excretion.

Running head: WB-PBPK model for CMS and colistin in pigs

Alexis Viel^{1,2,3}, Jérôme Henri², Salim Bouchène⁴, Julian Laroche^{1,5}, Jean-Guy Rolland², Jacqueline Manceau², Michel Laurentie², William Couet^{1,3,5}, Nicolas Grégoire³

1. INSERM, Unit 1070, Poitiers, France
2. Anses, Laboratoire de Fougères, Fougères, France
3. UFR Médecine-Pharmacie, Poitiers, France
4. Certara, Paris, France
5. CHU de Poitiers, Poitiers, France

Corresponding author:

Nicolas Grégoire

Tel.: +33 5 49 36 64 36.

E-mail address: nicolas.gregoire@univ-poitiers.fr

ABSTRACT

Purpose: The objective of this work was the development of a whole-body physiologically-based pharmacokinetic (WB-PBPK) model for colistin, and its prodrug colistimethate sodium (CMS), in pigs to explore their tissue distribution, especially in kidneys.

Methods: Plasmatic and tissue concentrations of CMS and colistin were obtained after use of different doses of CMS and route of administration in pigs. The WB-PBPK model was developed based on these data according to a non-linear mixed effect approach and using NONMEM software. A detailed sub-model was implemented for kidneys to handle the complex disposition of CMS and colistin within this organ.

Results: The WB-PBPK model well captured the kinetic profiles of CMS and colistin in plasma. In kidneys, an accumulation and slow elimination of colistin were observed and well described by the model. Kidneys seemed to have a major role in elimination processes, through tubular secretion for CMS and through intracellular degradation for colistin. Lastly, to illustrate the usefulness of the PBPK model, an estimation of the withdrawal periods after veterinary use of CMS in pigs was done.

Conclusions: The WB-PBPK model may facilitate the inter-species extrapolations to human and explore the colistin induced-nephrotoxicity in human medicine.

Keywords: colistin; CMS; kidneys; PBPK model; pigs;

ABBREVIATIONS

ADME: Absorption, distribution, metabolism, excretion

BLOQ: below the limit of quantification

BW: body weight

CBA: colistin base activity

CMS: colistimethate sodium

DV: observed value

fu: unbound fraction

GFR: glomerular filtration rate

GIT: gastro-intestinal tract

HPLC-MS/MS: high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

IIV: interindividual variability

IPRED: individual prediction

IV: intravenous

IM: intramuscular

LOQ: limit of quantification

MRL: maximal residue limits

NLME: nonlinear mixed effects

OFV: objective function value

PBPK: physiologically-based pharmacokinetic

PK: pharmacokinetics

PRED: population prediction

RV: residual variability

SIR: sampling importance resampling

$t_{1/2}$: half-life

VPC: visual predictive checks

WB-PBPK: whole body physiologically-based pharmacokinetic

WP: withdrawal period

INTRODUCTION

Colistin is an old peptide antibiotic from the polymyxin family that is used in human and veterinary medicine. In food producing animals, colistin is widely used as colistin sulphate to treat bacterial digestive infections. The use of its pro-drug, the colistimethate sodium (CMS), is the most frequent in human medicine but CMS can also be found as animal treatment. In human, this antibiotic has become the last resort in particular for fighting multi-resistant bacteria (1). Colistin is the active moiety and is formed from CMS hydrolysis within the body (2). CMS is a mixture of methanesulfonated molecules which are hydrolysed in derivatives with less methanesulfonate groups to finally form colistin (3). The structure of colistin and its prodrug makes their absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) upon the dependence of quite complex and mostly unexplained biological mechanisms (see below). Because of the renewed interest about this antibiotic, clarifying this complexity is nevertheless essential in order to facilitate current needs for dosing adjustments and avoid toxic effects (4).

Colistin and CMS have a high molecular weight (1167 g/mol and 1632 g/mol, respectively) and are ionized (cationic and anionic, respectively) at physiological pH (5) which implies a weak passage of cellular membranes and physiological barriers. Hence, their distributions are supposed to be mainly within the extracellular spaces (6). Colistin is also suspected to bind to tissues according to few studies with animals (7, 8). Concerning elimination mechanisms, CMS is partially excreted unchanged in urine, as seen in healthy humans and rats (2, 6). Conversely, colistin excretion through urine is very low due to the major reabsorption from the tubules after glomerular filtration (2) and colistin tends to accumulate in kidney tissue (9, 10). Specifically, this extensive reabsorption originates from the proximal tubular lumen (11, 12) which gives a predominant accumulation within the proximal tubular cells (13). Carrier-mediated uptake have been highlighted, involving different renal transporter like PEPT2 (14) or megalin (10). Moreover, an accumulation of polymyxins in intracellular organelles (like mitochondria and endoplasmic reticulum) has been shown (11) which could be linked to cellular death-pathways (15) and nephrotoxic effects (15, 16). Colistin is mainly eliminated via degrading pathways, probably through hydrolysis mechanisms considering its peptidic structure (1). However, the actual underlying mechanisms are still unknown.

Thus, the disposition of CMS and colistin within kidneys is not fully understood but has great implication in clinical practice, due to the limiting nephrotoxicity. Classical pharmacokinetic approaches could be used to describe plasmatic profiles of both compounds but are inefficient to handle tissue concentrations. Moreover, it is quite difficult to collect experimental data in humans, especially in tissues, for obvious ethical reasons. Physiologically-based pharmacokinetics (PBPK) modelling based

on animal experiments is hence a pertinent approach for this task. In addition to their ability to describe tissue distributions, these models are useful to perform some extrapolations from animals to human (17). A previous whole-body PBPK (WB-PBPK) model has been developed for CMS and colistin from rat experiments (18). However, several assumptions have been made, especially for the renal/urinary distribution of CMS and colistin without experimental tissue data to support them. One advantage of this PBPK model was the use of a non-linear mixed effect (NLME) modelling approach (19) in order to handle inter-individual variabilities. Here, we refined this WB-PBPK model using numerous experimental plasmatic, urinary and tissue data from pigs, with a special focus on kidney exposure to colistin. Pigs were chosen for their physiological proximity to human (20) allowing future inter-specie extrapolations.

The description of colistin pharmacokinetics in whole body is also interesting in the veterinary field. Indeed, for food safety concern, maximal residue limits (MRL) for colistin have been defined in edible tissues originating from treated food producing animals (21), as for pigs. These thresholds ensure that the consumer can eat products from treated animals without risk for its health. Therefore, a period is necessary between the last administration and the production of foodstuffs from such animals in order to get colistin concentrations below the MRL. This time is regulatory defined as the withdrawal period (WP). Linear regression based-methods are traditionally used to estimate the WP (22). However, the development of population PBPK modelling for this purpose is on going, due to their ability to predict tissue concentrations (23).

The aim of this study was first the development of a population PBPK model in pigs for colistin and its prodrug, CMS, using a NMLE approach with a focus on the renal disposition of both compounds. As an application of this PBPK model, its predictive ability to describe plasma and tissue concentrations was then used for estimating withdrawal periods of colistin in pigs, highlighting one of the advantages of this modelling approach.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

CMS (Colymicine 1 MIU; Sanofi Aventis, Paris, France) was used for all experiments. It was freshly reconstituted in 0.9% NaCl prior to each administration. To avoid any spontaneous hydrolysis of CMS into colistin, reconstituted CMS solutions were kept at +4°C and administered within the first hour after reconstitution.

Animals

Forty-six (46) crossbred female swine (Duroc × Landrace × Large white) were purchased from INRA (Le Rheu, France) with no history of polymyxin treatments. The animals were housed in collective pens and acclimatized for one week under standard farming conditions before the experiments. They were between 12 and 14 weeks old with a body weight (BW) ranging from 45 to 55 kg at the beginning of the experiments.

Then pigs were housed by groups of two for those receiving repeated intramuscular (IM) administrations. For pigs carrying a venous catheter, they were kept alone in metabolism cages for a maximum of 4 days.

Animal killing was performed with electronarcosis, that induces instantaneous insensibility, following by bleeding with aorta section.

All experiments were conducted in accordance with the local ethical comity and were registered under the references 2905-2015112717486085 and 6528-201608251410563.

In vivo experiments

- Catheter implantation

For pigs receiving at least one intravenous (IV) administration of CMS, central venous catheters were implanted. These animals were firstly sedated with an IM injection of ketamine at 20 mg/kg (Imalgène, Merial, Lyon, France) and xylazine at 2 mg/kg (Rompun, Bayer, Loos, France). Then, they were intubated and kept anesthetized by inhalation with isoflurane 2.5% (IsoFlo, Zoetis, Malakoff, France) during all the surgical procedure. Under local anaesthesia with xylocaine (Xylovet, CEVA, Libourne, France), an incision was performed on the neck. After dilaceration of superficial tissues and muscles, two catheters were implanted in the jugular vein, one for drug administration and one for blood sampling. After the surgery, pigs rested 48 h after the surgery alone in their box. Then, they were housed separately in metabolism cage in order to facilitate drug administration and blood/urine sampling.

- Sampling

Blood sampling: for pigs harbouring a venous catheter, 1.5 mL of blood was taken at each sample. Catheter was then flushed with heparinised saline solution. Pigs without catheter were restrained by an operator using a snout rope while a second one was sampling blood with a vacuum tube from the external jugular vein. Immediately after sampling, plasma was separated by centrifugation (3000 g) at 4° and kept in Polypropylene tubes at -80°C until assay.

Urine sampling: spontaneous urination was gathered only from animals kept in metabolism cage; volume of urine was measured and then a 20 mL-sample was kept in Polypropylene tubes at -80°C until assay.

Tissue sampling: each organ (except muscles, fat and skin) was entirely collected, weighted and its volume measured by water displacement. A sample was taken from the area of the left gluteal muscle (including skin) for skin and muscles analysis. A piece of abdominal fat was taken for the adipose analysis. Then, tissues were cut into small pieces, rinsed with saline solution, put into Polypropylene tubes and kept at -80°C until assay.

- Experimental setup for PBPK model calibration

Different dosing regimens (doses and route of administration) of CMS were administered for model calibration (a brief description is given in Table I). It is of note that some pigs were used for several experiments (n°1, 2 and 3, see below): in that case the potential residual concentrations from previous administrations were considered in the modelling analysis:

Experiment N°1/Plasma and kidney PK after a single IV administration (10 pigs): a 1-h constant IV infusion of CMS at 125,000 UI/kg of BW (corresponding to 3.75 mg/kg CBA or 10 mg/kg of CMS base(24)) was administered via the central catheter. Blood samples (n=12 per pig) and urine samples (between 2 and 9 per pig) were taken over a 32 h-interval. Four pigs were sacrificed at 32 h and their kidneys were immediately removed and processed as described in sampling section.

Experiment N°2/Plasma PK after a single IM administration (6 pigs): CMS solution (125,000 UI/kg of BW) was administered as two injections of about 10 mL into gluteal muscle of each side. Blood samples (n=12 per pig) were taken over a 24 h-interval.

Experiment N°3/Tissue partition coefficients (6 pigs): A dosing regimen was elaborated to achieve steady state of CMS and colistin in order to estimate the tissue to plasma partition coefficients (Kp). Pigs were firstly infused during 1 h with a loading dose of CMS at 75,000 UI/kg; then a break of 1.5 h was done to get sufficient *in vivo* hydrolysis of CMS into colistin; finally, 50,000 UI/kg of CMS was administered as a 4 h-infusion. Blood samples were taken during the 4 h-infusion to assess steady-state in plasma; at the end of the infusion pigs were sacrificed and their blood, lungs, brain, heart, abdominal fat, skin, gluteal muscle, duodenum, liver and kidneys were immediately removed and processed as described in sampling section.

Experiment N°4/Plasma and kidney PK during and after repeated IM administrations (15 pigs): repeated CMS administrations were performed to study colistin renal accumulation. Pigs were randomly divided into 5 groups of 3 individuals. They received two IM injections of CMS per day at 25,000 UI/kg with a day-delay of 9 h (and 15 h during night). One group received 2 administrations (1 day) and were slaughtered 15 h after last injection; one group received 6 administrations (3 days) and were slaughtered 15 h after last injection; last 3 groups received 14 administrations (7 days) and were sequentially slaughtered at 15, 39 and 63 h after last injection. IM administrations were given on the neck and on top of gluteal muscles with a side alternation at each injection. Blood samples were taken during the treatment period in a sparse sampling way (between 1 and 3 per pig), each animal being sampled every 48 h at most. At sacrifice, blood and kidneys were collected and processed as described in sampling section.

- Experimental setup for model validation

Experiment N°5/Tissue and plasma PK after IM injections of CMS following the recommended veterinary dose (20 pigs): repeated CMS administrations were performed over 3 days with two IM injections per day at 25,000 UI/kg with a day-delay of 9 h (and 15 h during night). Then, pigs were sacrificed by group of 4 at 1 h, 3 h, 5.5 h, 7.5 h, 15 h after last administration and their blood and fat, muscles, kidney, liver, skin (edible tissues) were collected as described above.

Determination of the unbound fraction (fu) of CMS in plasma

The plasmatic fu of colistin in pigs (40%) was obtained from the literature (25). As no value was retrieved for CMS in the literature, we estimated fu_{CMS} by ultrafiltration. Briefly, CMS was added to blank plasma from pig at a theoretical concentration of 5 µg/mL and 0.5 µg/mL, then ultra-filtrated through a cellulose-membrane (Centrifree, Merck, Alsace, France) by centrifugation (3000 g) at 37 °C during 30 min. A similar experiment was performed in buffer instead of plasma in order to estimate the loss due to CMS hydrolysis at 37 °C in plasma (3), and the potential non-specific binding of CMS to the lab materiel (5). All filtrates were kept at -20°C before assay (less than 1 week). All these experiments were realized in triplicates.

Table I: Summary of pharmacokinetic experimental studies of CMS and colistin in swine used for calibration and validation of the PBPK model

Modelling purpose	N° of experiment	Route	Dose of CMS (UI/kg)	Number of pigs	Number of doses	Numbers of samples per pig (min-max)
CALIBRATION	1	IV	125,000 (1 h- infusion)	10	1	Blood: 12 Urine: (2-9) Kidneys: 1
	2	IM	125,000	6	1	Blood: 12
	3	IV	75,000 during 1 h; 1.5 h without administration; 50,000 during 4 h	6	1	Blood: (1-4) All organs: 1
	4	IM	50,000 (divided in two administrations of 2 per day)	15	Up to 7 (i.e. 14 injections)	Blood: (1-4) Kidneys: 1
VALIDATION	5	IM	50,000 (divided in two administrations of 2 per day)	20	3 (i.e. 6 injections)	Blood: 1 Kidneys, fat, skin, liver, muscles: 1

Notes: The abbreviations for the route: IM, intramuscular injection; IV, intravenous injection. Some pigs were used in different experiments (n°1, 2 and 3) in model calibration.

Analytical methods

Plasma and urinary CMS and colistin concentrations were assayed with a validated high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method using polymyxin B as internal standard, as described elsewhere (26). With this analytical method, CMS determination is achieved in an indirect way: a separate aliquot of each sample was pre-treated with sulphuric acid to hydrolyse CMS to colistin and the concentration of CMS was then determined by difference between the concentrations measured before and after the acid hydrolysis, accounting for the differences in molecular weights of CMS and colistin

For tissues, this method was adapted. Briefly, standards and quality controls were prepared from blank tissues. A sample of 100 mg for each organ was taken and 980 μ L of blank plasma was added before homogenization with T-18 Ultra-Turrax homogenizer (KA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Germany). Then 20 μ L of a colistin solution (diluted in a 50/50 mix plasma/water) was added to obtain standard curves. After vortexing and centrifugation (4000 rpm for 10 min), supernatants were assayed as described for plasma (26). For samples, the same procedure was realized but 20 μ L of a 50/50 mix plasma/water solution was added instead of 20 μ L of colistin solution. Calibration range of colistin was from 0.020 μ g/mL to 10 μ g/mL in plasma and 0.2 to 100 μ g/g in tissues; the concentrations of quality controls were at 0.16, 0.63 and 3.80 μ g/mL in plasma and 0.5, 5 and 75 μ g/g in tissues; the limit of quantification were 0.02 μ g/mL for colistin in plasma; 0.2 μ g/g for colistin in all tissues. For CMS, the LOQ was 0.15 μ g/mL in plasma and 1 μ g/g in tissues,

For the assay in kidney, the intracellular localization of colistin made imprecise the discrimination between colistin and CMS concentrations (Burden, 2012). Indeed, the lysis of cells occurred both during the crushing phase and the acidic phase used for CMS determination. Therefore, the concentrations measured in kidneys corresponded to the sum of CMS and colistin, expressed as colistin.

Development of the PBPK model

- Model structure

PBPK model was based on a previous published model (18). It is composed of 9 compartments corresponding to the main body organs (lungs, heart, liver, fat, skin, gastro-intestinal tract, brain, muscles, and kidneys), two blood compartments (arterial/venous) and one excretion compartment

(urine) (Fig. 1A). Remaining body was lumped into a compartment named “rest of body”. Each compartment was defined by a physiological volume and blood flow that were found in the literature and defined as fractions of total bodyweight and cardiac output, respectively (Table II) (25, 27-42). The cardiac output was corrected by the haematocrit to get the total plasmatic flow. Each compartment except kidney was described as a well-stirred and flow-limited compartment, consistent with the distribution of CMS and colistin mainly into the extracellular fluid (6).

Drug distribution in each compartment tissue (except kidney and bladder) was upon the dependency of the Kps. CMS and colistin Kps were determined at the end of the perfusion established to reach the steady state for both drugs (experiment n°3) as follows (Eq. 1):

$$Kp = \frac{C_{tis_ss}}{C_{plas_ss}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where Kp is the partition coefficient of the tissue, C_{tis_ss} is the concentration of CMS or colistin in the tissue at steady-state, C_{plas_ss} is the plasmatic concentration of CMS or colistin at steady-state.

As CMS is spontaneously hydrolysed into colistin *in vivo*, a conversion of CMS into colistin based on a common hydrolysis constant (K_{hyd_CMS}) was assumed to take place in all organs (18) (Fig. 1B) and estimated during model calibration. Thus, for each tissue an intrinsic hydrolysis clearance (CL_{hyd_CMS}) was expressed follows (Eq. 2):

$$CL_{hyd_CMS} = V_{tissue} \cdot K_{hyd_CMS} \quad (\text{Eq. 2})$$

Where V_{tissue} is the tissue volume.

For colistin, the elimination is mediated via mechanisms that have not been established yet. Similar to CMS, an elimination process was defined based on a common constant (K_{deg_COLI}) involved in all organs (Fig. 1B) and estimated during model calibration. The intrinsic degradation clearance (CL_{deg_COLI}) was defined as (Eq. 3) :

$$CL_{deg_COLI} = V_{tissue} \cdot K_{deg_COLI} \quad (\text{Eq. 3})$$

Where V_{tissue} is the tissue volume.

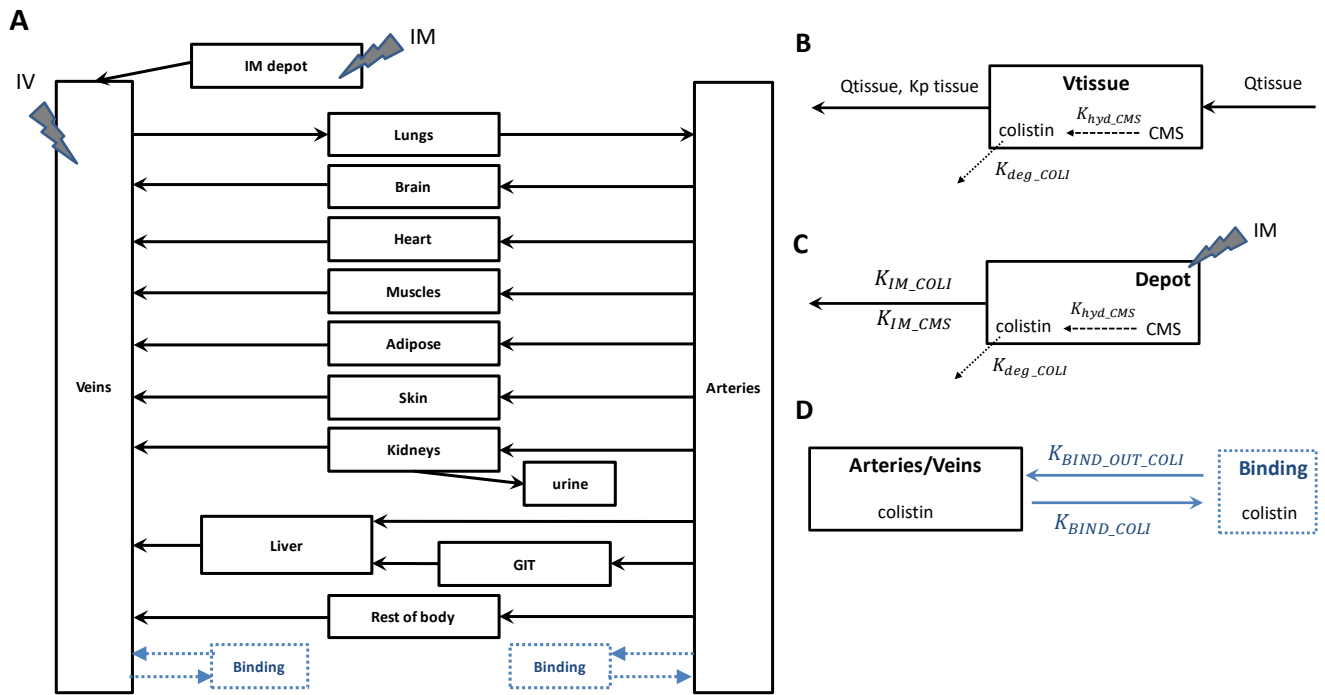


Figure 1: A global diagram of the physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model of CMS and colistin in swine

The whole body PBPK model is described (A), as well as the detailed mechanism in a generic tissue (except kidneys) (B), of the IM route (C) and of the vascular binding compartments for colistin (D).

During model development, supplementary components were added in the final model and are represented in blue (see Results).

Kidney sub-compartments and urine are detailed in Fig. 2. All estimated parameters (in italic) are detailed in Table III.

Vtissue: tissue volume; Qtissue: blood flow; Kp_tissue: partition coefficient; IV: intravenous dose; IM: intra-muscular dose. GIT : gastro-intestinal tract

Kidneys were subdivided into sub-compartments (Fig. 2) due to the particular distribution/elimination of polymyxin within this organ. Renal vascular, extra-vascular and tubular intracellular spaces as well as luminal proximal tubular compartments were defined (43). CMS is eliminated through glomerular filtration and urinary excretion (2). A glomerular filtration clearance was thus defined (CL_{GFR_CMS}), originating from kidney vascular space compartment and going into the proximal tubules one (43). CL_{GFR_CMS} was calculated as the product of the glomerular filtration rate (GFR) and the fu_{CMS} in plasma (experimentally determined). Colistin is excreted by glomerular filtration thus a filtration clearance was also added (CL_{GFR_COLI}), similarly to the CMS. However, colistin undergoes major tubular reabsorption. It was observed that more than 90% of excreted colistin was reabsorbed in rats (9). Colistin is then mainly located in proximal tubular cells as shown with *in vitro* studies with polymyxins (11-13). Therefore, a reabsorption clearance of colistin (CL_{reabs_COLI}) was estimated in the model, originating from the tubular lumen into the intracellular sub-compartment. Due to the lack of data and the kidney physiology that is close between human

and pig (20), the flow in the proximal tubule (Q_{TUB}) was fixed to the human value, i.e. about 67% of GFR (44). Bladder compartment was used as a transitory compartment receiving urine from tubular lumen and evacuating it, with an exit flow (Q_{URI}) determined in pigs kept in metabolism cage. This compartment was not considered as a vascularized tissue (no distribution).

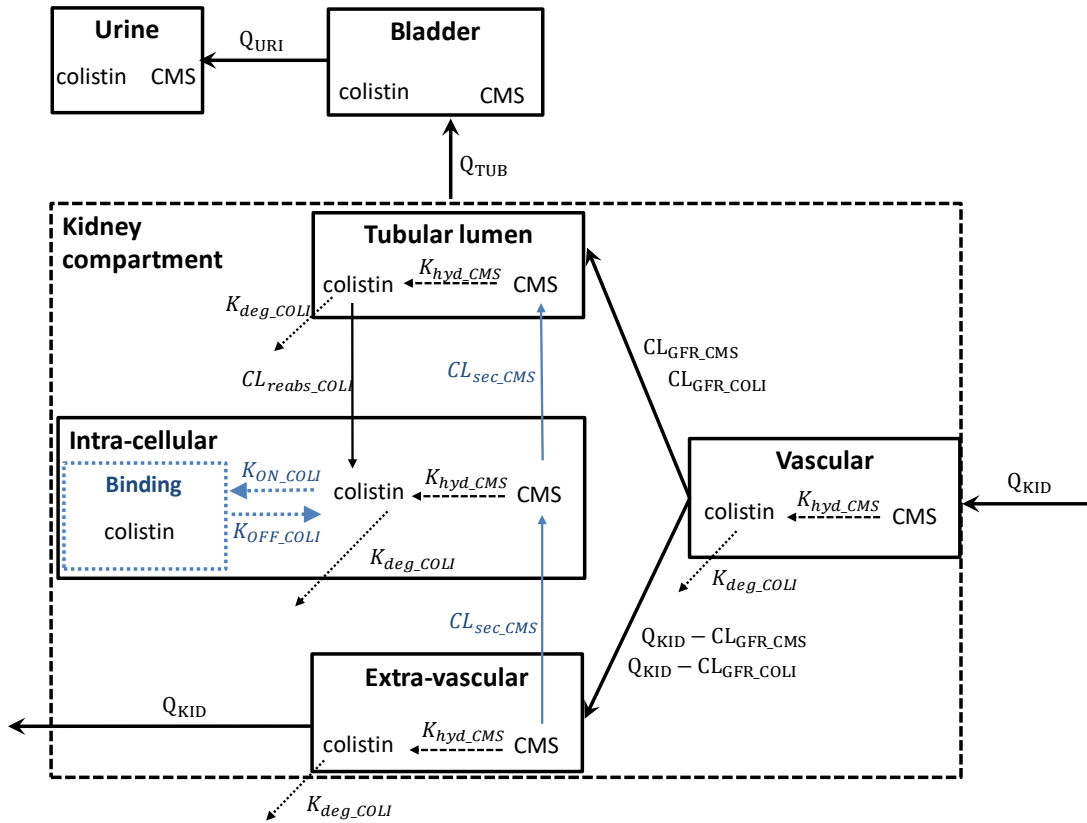


Figure 2: **Schematic representation of the final renal sub-compartments in the PBPK model of CMS and colistin in swine.**

All estimated parameters (in italic) are detailed in Table III.

During model development, supplementary components were added in the final model and are represented in blue (see Results).

Q_{KID} : renal blood flow; Q_{URI} : urinary flow; Q_{TUB} : tubular flow; $CL_{GFR_CMS}/CL_{GFR_COLI}$: filtration clearance of CMS and colistin

For IM administrations, a compartment of depot was added (45). Two absorption rate constants originating from this depot compartment to the venous one were estimated, one for CMS (K_{IM_CMS}) and one for colistin (K_{IM_COLI}). Intrinsic hydrolysis of CMS and elimination of colistin were supposed to occur in this compartment such as in all other compartments (Fig. 1C).

The differential equations describing all the mass transfer in the PBPK model are presented in the supplementary files.

- Model calibration and modelling method

A NLME modelling approach was used for the estimation of unknown parameters, inter-individual variabilities (IIV) and residual variabilities (RV) (19). Model structure was modified if needed and model selection was based on the physiological plausibility (as described above) and a parsimonious approach. A reduction in the objective function value (OFV) by more than 3.84, corresponding to a 5% significance level, was considered as a significant improvement in model fit. The sampling importance resampling (SIR) method (46) was used to obtain the 95% confidence interval (IC 95%) of the parameter estimates (5 iterations with 1000, 1000, 1000, 2000, 2000 samples and 200, 400, 500, 1000, 1000 resamples for each).

For IIV, a log-normal distribution of parameters was assumed. IIV was firstly estimated for each parameter separately and kept only if a significant decrease in OFV was observed without adding uncertainties in the estimation of fixed effects. Then, selected IIV were added all together and a backward procedure was applied to obtain the final IIV model.

For RV, additive and proportional error structure models were tested. Furthermore, for CMS and colistin concentrations determined in the same sample (see details of the analytical method), the L2 data item method was used in order to estimate potential correlation between their RV (47). The M3 method was used to handle data below the LOQ (BLOQ) (48).

The calibration step was performed with all experimental data described in section “Experimental setup for model calibration” and summarized in Table I. Concentrations were log-transformed before modelling. For urine data, CMS and colistin could not be discriminated due to the spontaneous hydrolysis of CMS into colistin after excretion (2, 6). Thus, all observed concentrations were converted as CMS quantities (thanks to molecular ratio and measured urine volume) and pooled. Accordingly, urinary CMS and colistin model predictions were also pooled. Predictions in kidney corresponded to the amount of colistin and CMS in the different kidney sub-compartments (vascular, extra-vascular, intracellular and tubular lumen) divided by the sum of their respective volumes. Moreover, colistin and CMS concentrations in kidney were pooled for the analysis (*cf.* analytical methods).

Half-life of each compound given by the model was calculated as the time required for the median concentration to decrease by 50% in the target compartment. Total clearances of each compound were calculated as the dose of CMS, or as the total formed quantity of colistin, divided by the area under the curve of the plasmatic CMS, or colistin concentration, respectively. The renal clearances (CL_R) in this study accounted for the removal of compounds by all the routes of the

kidney, *i.e.* secretion/excretion processes and hydrolysis of CMS or degradation of colistin. Thus, they were defined as the product of renal extraction ratio by the renal flow (Q_{kid}):

$$CL_R = \frac{(C_{art} - C_{kid_VA})}{C_{art}} \cdot Q_{kid} \text{ (Eq. 4)}$$

With C_{art} : arterial concentration of CMS or colistin; C_{kid_VA} : concentrations of CMS or colistin in renal vascular compartment

- Model evaluation

The performances of the PBPK model were tested in a 2-step approach. An internal validation was firstly done based on graphical and statistical criteria. Goodness-of-fit was assessed by plotting observed (DV) versus individual prediction (IPRED) and population prediction (PRED). Then Visual Predictive Checks (VPC) were generated, stratified by experimental designs and organs, with 1000 simulated replicates from the calibration dataset (Experiments n°1 to n°4, see Table I). The 5th and 95th percentile of the model predictions were plotted to see if the experimental data were included within this interval.

Then, an external validation was done with the independent dataset that was not used for calibration (Experiment n°5). This experiment followed the recommended veterinarian CMS doses. All parameters estimated during model calibration (fixed and random effects) were fixed. No RV was estimated for concentrations in tissues (except kidneys) during calibration because these tissue data were only used to determine the CMS and colistin Kps. Therefore, a common RV value between those estimated in plasma and kidney was chosen for the predictions of colistin concentrations in all other tissues. Simulations by organ were generated and the predictive ability of the PBPK model was assessed by visualizing the distribution of the validation data within the 90% prediction intervals. Only compartments involved in withdrawal period calculations (fat, skin, muscles, liver and kidney) and plasma were analysed.

A local sensitivity analysis was performed on the estimated structural parameters to assess the influence of these parameters (associated to potential uncertainties) on model predictions. This analysis was performed only for kidney predictions, which was the main tissue of interest. The sensitivity analysis consisted in a $\pm 10\%$ perturbation of each parameter estimate, all other parameters estimate being unchanged. The output considered for sensitivity was the time when the median model prediction for concentration in kidney felt below its MRL (0.20 $\mu\text{g/g}$).

- Model application: Withdrawal period estimation

To estimate withdrawal period, we generated a 98 % prediction interval (*i.e.* 99% unilateral) (49) from 1000 simulations of the individual predicted profiles (without RV) of virtual pigs of 50 kg receiving the dosing scheme of CMS used in veterinary medicine. Then, the same approach was done with a virtual pig of 100 kg (which is close to the real slaughter weight). These simulations were performed with all structural parameters and their IIV (if present) estimated with the final model. Times for which the upper prediction limit fell below the MRL for each tissue intended for human consumption were determined. Then, the highest time from all of them was chosen as the final withdrawal time.

Software

The modelling was performed using NONMEM 7.4 (ICON Development Solutions, Ellicott City, Maryland, USA) with the first order conditional estimation method including eta-epsilon interaction (FOCE-I) and ADVAN 14. Perl speaks NONMEM (50) and Piraña (51) were used in order to facilitate the modelling work. All graphs were done using R software (version 3.4.1, www.R-project.org).

Table II: physiological and chemical-specific parameters for PBPK model

Compartments	Volume (fraction of BW)	References	Blood flow (fraction of CO)	References
Arterial blood	0.027	(28, 41)	1	-
Venous blood	0.053	(28, 41)	1	-
Lung	0.027	(35)	1	-
Brain	0.0034	(31, 39, 41)	0.02	(39, 40)
Heart	0.0062	(31, 41)	0.037	(29, 30)
Muscles	0.38	(31, 40)	0.2	(34, 40, 41)
Skin	0.077	(31, 41)	0.05	(37)
Adipose	0.18	(31, 41)	0.17	(34, 40)
GIT	0.062	(31, 39, 40)	0.22	(38, 39)
Liver	0.027	(31, 39, 41)	Hepatic artery + GIT blood flow: 0.27	(34, 38, 39)
Kidneys	0.0048	(31, 41)	0.13	(38-40)
Vascular	0.067 ^a	(27, 29)	-	-
Extravascular	0.12 ^a	(30)	-	-
Tubular lumen	0.2 ^{a,b}	(36)	-	-
Intracellular	0.613 ^{a,c}		-	-
Bladder	0.01 ^d	-	-	-
Rest of Body	0.14 ^e	-	0.12 ^f	-
TOTAL	1	-	1	-
Other parameters (units)	Value	References		
Cardiac output ^g (L/h/kg)	8.5	(27, 39, 40)		
Haematocrit	0.40	(42)		
GFR (L/h/kg)	0.10	(32)		
Urinary flow (L/h/kg)	0.0022	Experimental data		
Tubular flow (L/h/kg)	67% of GFR	(36)		
Colistin partition coefficient (Kp)	Mean value +/- SD (unitless)	References		
Lung	0.73 ± 0.31	Experimental data		
Brain	0.71 ± 0.37			
Heart	0.29 ± 0.14			
Muscles	0.10 ± 0.029			
Skin	0.43 ± 0.17			
Adipose	0.25 ± 0.11			
GIT	0.41 ± 0.17			
Liver	0.52 ± 0.26			
Kidneys	NC	-		
Rest of body	0.4	Fixed to the mean of others Kps		
Unbound fraction CMS	0.37	Experimental data		
Unbound fraction colistin	0.4	(25)		

^a defined as fraction of kidney volume; ^b fixed to human value; ^c calculated by subtracting all fractions of the 3 other sub-compartments; ^d arbitrary fixed; ^e calculated by subtracting all fractions of the other organs; ^f

calculated by subtracting all fractions of the other organs except arteries, veins and lung; ^g Cardiac output was multiplied by (1 – haematocrit) to get the total plasmatic flow

NC : not concerned ; GFR : glomerular filtration rate ; GIT : gastro-intestinal tract

RESULTS

- Unbound fraction of CMS in plasma

We experimentally determined the f_{u_CMS} by ultra-filtration at 37°C (Table III). About 28 % of CMS was lost in buffer solution due to the CMS degradation (hydrolysis) and the non-specific binding to the tube (but not to the filter). Accounting for this loss, we could estimate an average f_{u_CMS} of 37 ± 3 % for pigs.

Table III: Results of experiments for the determination of plasmatic unbound fraction of CMS in pigs (n=3)

Theoretical CMS concentration in parent solution (µg/mL)	Media	Measured CMS concentration in parent solution (µg/mL)	CMS concentration in ultrafiltrate (µg/mL)	Fraction of loss	Unbound fraction
5	Phosphate buffer	6.3	$4,5 \pm 0,5$	28%	NC
5	Pig plasma	4.4	$1,2 \pm 0,12$	73%	$0.38 \pm 0,04^a$
0.5		0.49	$0,12 \pm 0,01$	75%	$0.36 \pm 0,02^a$

^a: Calculated accounting for the loss due to the CMS degradation (hydrolysis) and the non-specific binding to the tube determined in phosphate buffer; NC : not concerned

- Model structure and calibration

Results obtained with the experimental data induced some modifications of the original model. Firstly, concerning CMS Kps, about 80% of tissue concentrations (except kidney) were under the LOQ (1 µg/g of tissue) at steady-state. Therefore, these Kps could not be measured experimentally and were estimated by the model (M3 method for data below the LOQ). However, estimation of one specific Kp for each organ was impossible and a Kp of CMS common for all tissues (Kp_{mix_CMS}) as well as a common RV value for CMS concentrations in tissues were estimated (except for kidneys). Colistin Kps were measured and the values are reported in Table II. For muscles, 3 concentrations over 6 were below the LOQ and were fixed at LOQ/2 for calculation.

Secondly, one additional compartment was added to each vascular compartment (arteries and veins) in order to fully describe the plasmatic colistin kinetic profile. These two compartments, referred as colistin “binding compartments”, were volume-less and with two different estimated transfer constants (K_{BIND_COLI} and $K_{BIND_OUT_COLI}$) (Fig. 1D).

Thirdly, structural modifications were needed for the kidney sub-model (permeability-limited model). Due to the protein binding of CMS, a secretion clearance of CMS (CL_{sec_CMS}) from the extra-vascular compartment towards the tubular lumen through the intracellular compartment was added to explain the renal clearance of CMS (Fig. 2). A rate of degradation of colistin (K_{deg_COLI}) in kidneys different from that in other organs was estimated but did not improve significantly the fitting. Non-linear mechanisms of renal colistin elimination were also tested, without significant improvement of the fitting. An intracellular binding compartment (volume less) significantly improved the fitting (decrease in OFV of 20), with two different estimated “in and out” transfer constants (K_{ON_COLI} and K_{OFF_COLI}). Because CMS and colistin could not be distinguished in urine, the fraction of colistin reabsorbed in proximal tubules could not be accurately estimated. Therefore, the proportion of colistin reabsorbed (driven by CL_{reabs_COLI}) was estimated from data in human healthy volunteers (6) and fixed at 97.5%.

The parameter estimates of the PBPK model after model calibration are reported in Table IV. For each structural parameter, CI 95 % were satisfying (the wider interval being for the colistin absorption constant from IM depot, K_{IM_COLI}) highlighting the good precisions of the estimates. Overall, uncertainty for CMS parameters was lower than for colistin ones. Proportional residual errors were chosen as the best error models and the highest estimated RV was for kidney data (57%). Two inter-individual variabilities, one associated to K_{nr_COLI} (26.6%) and the other to CL_{SEC_CMS} (43.5%), were estimated.

Table IV: CMS and colistin parameters optimised in the PBPK model

Parameters (unit)	Value [CI 95%]	IIV [CI 95%]	Meaning
CMS			
K_{hyd_CMS} (h^{-1})	0.262 [0.238-0.290]	-	CMS hydrolysis constant (common for all compartments)
K_{IM_CMS} (h^{-1})	1.78 [1.39-2.35]	-	Absorption constant of CMS for intra-muscular route
Kp_{mix_CMS} (unitless)	0.217 [0.189-0.242]	-	Kp of CMS compartments (common for all compartments)
CL_{sec_CMS} ($L \cdot h^{-1}$)	8.39 [6.53-10.94]	0.193 (43.5%) [0.0840-0.403]	Tubular CMS secretion from kidney vascular space to tubular lumen
Colistin			
K_{deg_COLI} (h^{-1})	0.389 [0.334-0.456]	0.0737 (26.6%) [0.0437-0.139]	Colistin non-renal eliminating constant (common for all compartments)
K_{IM_COLI} (h^{-1})	5.99 [3.09-13.77]	-	Absorption constant of colistin for intra-muscular route
K_{BIND_COLI} (h^{-1})	0.187 [0.135-0.295]	-	"Binding" constant of colistin in vascular compartments
$K_{BIND_OUT_COLI}$ (h^{-1})	0.104 [0.0670-0.149]	-	"Unbinding" constant of colistin in vascular compartments
K_{ON_COLI} (h^{-1})	0.0910 [0.0524-0.157]	-	"Binding" constant of colistin in kidney intracellular compartments
K_{OFF_COLI} (h^{-1})	0.0145 [0.0051-0.0230]	-	"Unbinding" constant of colistin in kidney intracellular compartments
CL_{reabs_COLI} ($L \cdot h^{-1}$)	106 (fixed)	-	Reabsorption of colistin tubular lumen into intracellular compartment
Residual errors (proportional)			
RV_{plas_CMS} (CV%)	41 [37-47]	-	Proportional residual error for plasmatic CMS concentrations
RV_{plas_COLI} (CV%)	41 [37-45]	-	Proportional residual error for plasmatic colistin concentrations
Common RV term of CMS and colistin in plasma (CV%)	28 [23-34]	-	L2 data item method
RV_{tissue_CMS} (CV%)	33 [25-44]	-	Proportional residual error for the tissue CMS concentrations
RV_{KID} (CV%)	57 [44-76]	-	Proportional residual error for kidney total concentrations
RV_{URINE} (CV%)	51 [41-63]	-	Proportional residual error for urinary total concentrations

IIV: inter-individual variability; CI: confidence interval; CV: coefficient of variation

- Model evaluation

Model diagnostics showed acceptable goodness-of-fit plot for the final model (supplementary material, Fig. S1).

The VPCs generated for the internal validation showed very good agreement between model predictions and CMS and colistin concentrations measured in plasma, either after one IV of CMS (experiment n°1, Fig. 3A), one IM of CMS (experiment n°2, Fig. 3B) or after the dosing regimen implemented to achieve steady-state (experiment n°3, Fig. 4A). Model prediction of plasmatic concentrations was very good after repeated IM administrations (experiment n°4, Fig 4B), even if the median predictions were slightly below the measured peak of plasmatic concentrations for both compounds. However, distribution and elimination phases were well characterized. Overall, data BLOQ were well predicted by the model as shown on Fig 3A and 3B. For the repeated IM injections, collected data were sparse so the fractions of data BLOQ were not presented due to graphical reasons. However, the only discrepancy was at 9 h just before the second IM injection because all observed colistin data were BLOQ in contrast to the model prediction (Fig 4B).

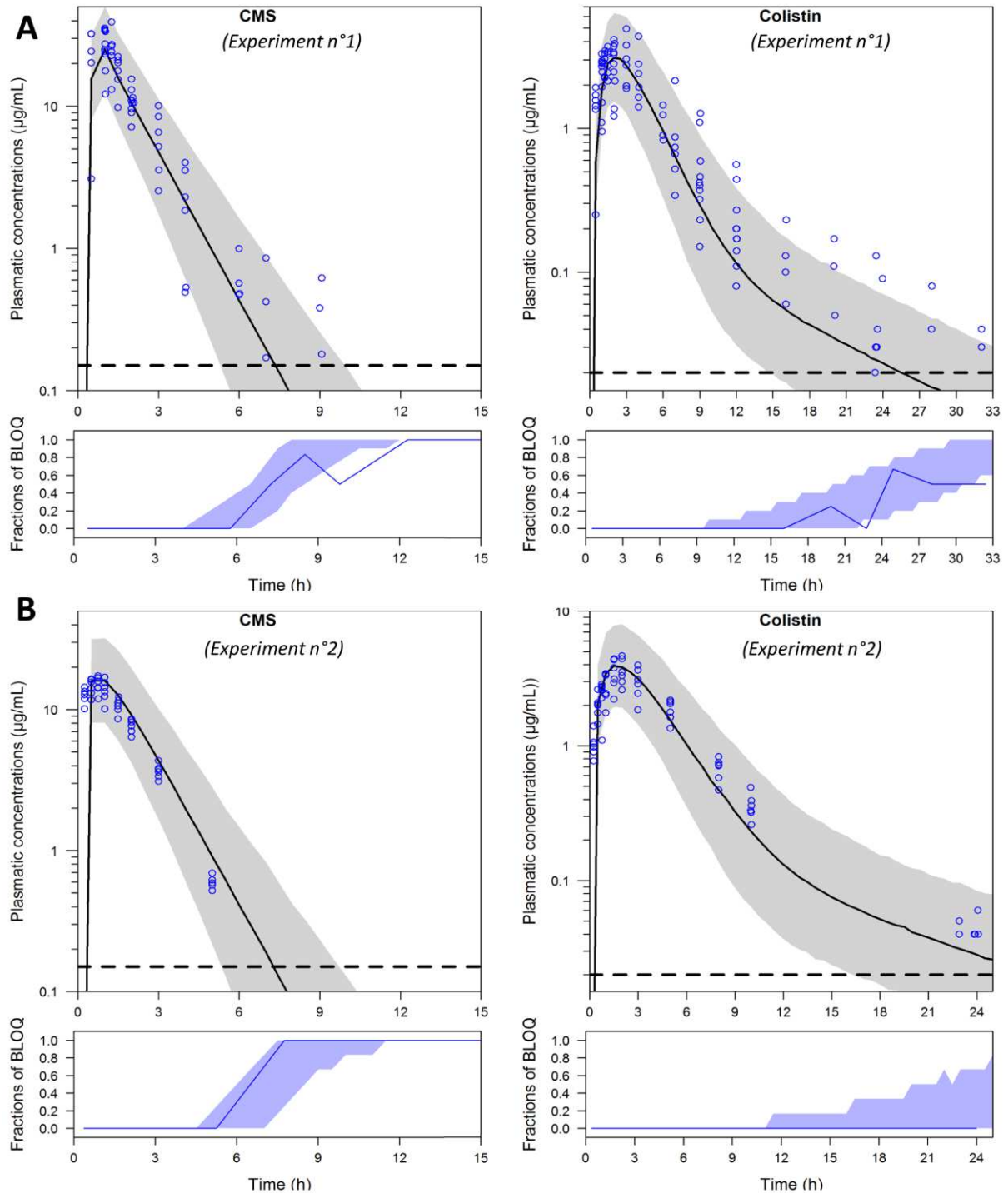


Figure 3: **Plasmatic data from experiments n°1 and n°2 used for model calibration.**

Visual Predictive Checks (VPC) of the PBPK model for CMS and colistin plasmatic concentrations after one IV (A), one IM (B) of CMS.

Closed circles represent the observed plasma concentrations; the grey areas represent the 90% prediction interval of the model, whereas the black solid line represents the median; the horizontal dashed black lines represent the LOQs. In the smaller panels, blue areas represent the simulation-based 95% confidence intervals for the fraction of model simulated samples below the limit of quantification (BLOQ) at each time point, whereas the blue solid line represents the actual observed fraction of BLOQ samples.

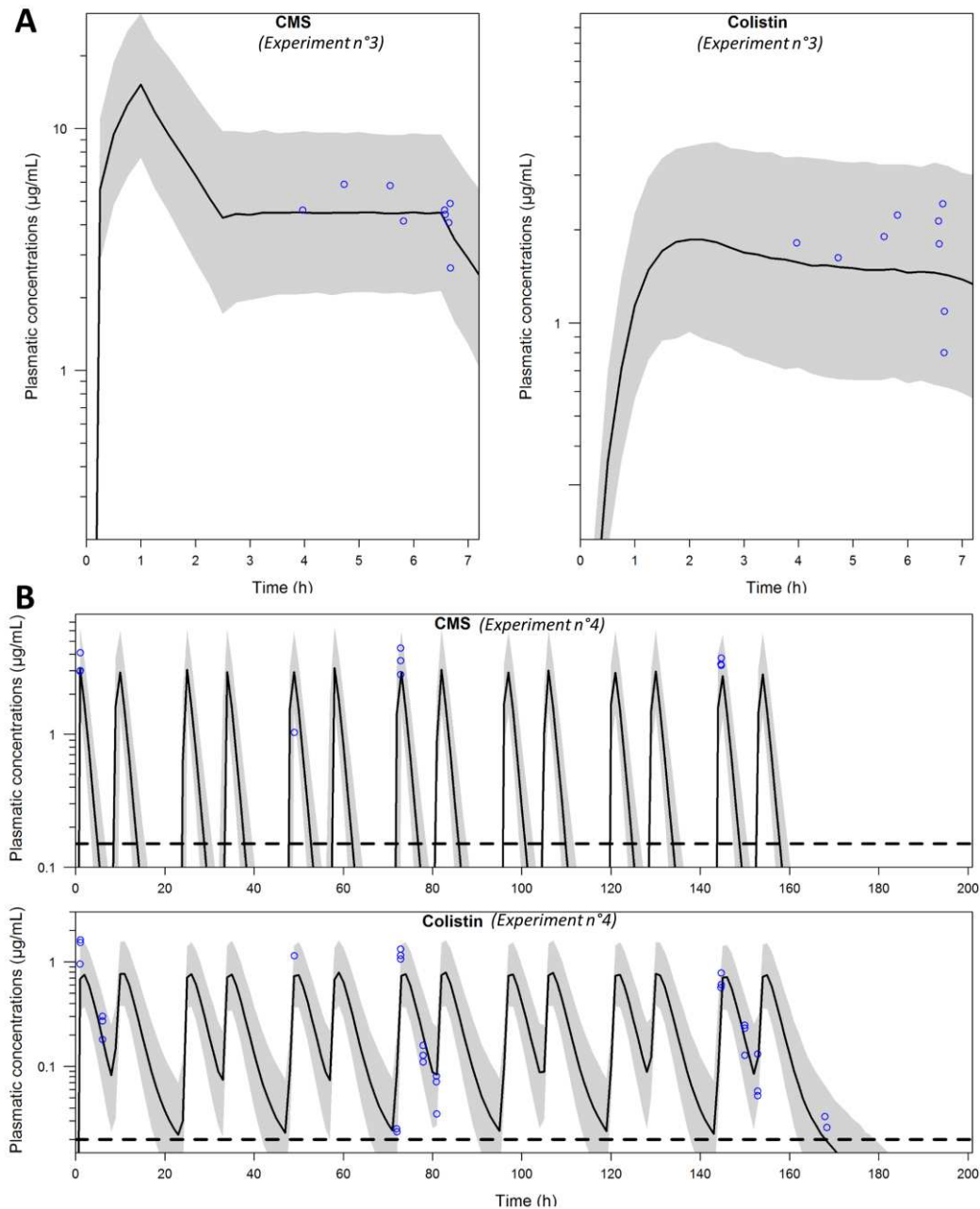


Figure 4: **Plasmatic data from experiments n°3 and n°4 used for model calibration.**

Visual Predictive Checks (VPC) of the PBPK model for CMS and colistin plasmatic concentrations after a dosing scheme to achieve steady-state (A) and repeated IM administrations (B) of CMS.

Closed circles represent the observed plasma concentrations; the grey areas represent the 90% prediction interval of the model, whereas the black solid line represents the median; the horizontal dashed black lines represent the LOQs.

No data below LOQ were observed in A. For B, fractions of BLOQ are not represented due to the sparse sampling but they are discussed in the text.

Concerning kidney sub-model, cumulative urinary data after one IV administration of CMS were well predicted by the model (Fig. 5). For renal concentrations, the average model well captured the overall observed data, noticeably the renal accumulation (Fig. 6C), but there was a high variability between the different experiments, with some under-predictions (Fig. 6B) or over-predictions (Fig.

6A and late points of Fig. 6C). This variability is taken into account by the model thanks to the high estimated IIV and the large 90% CI.

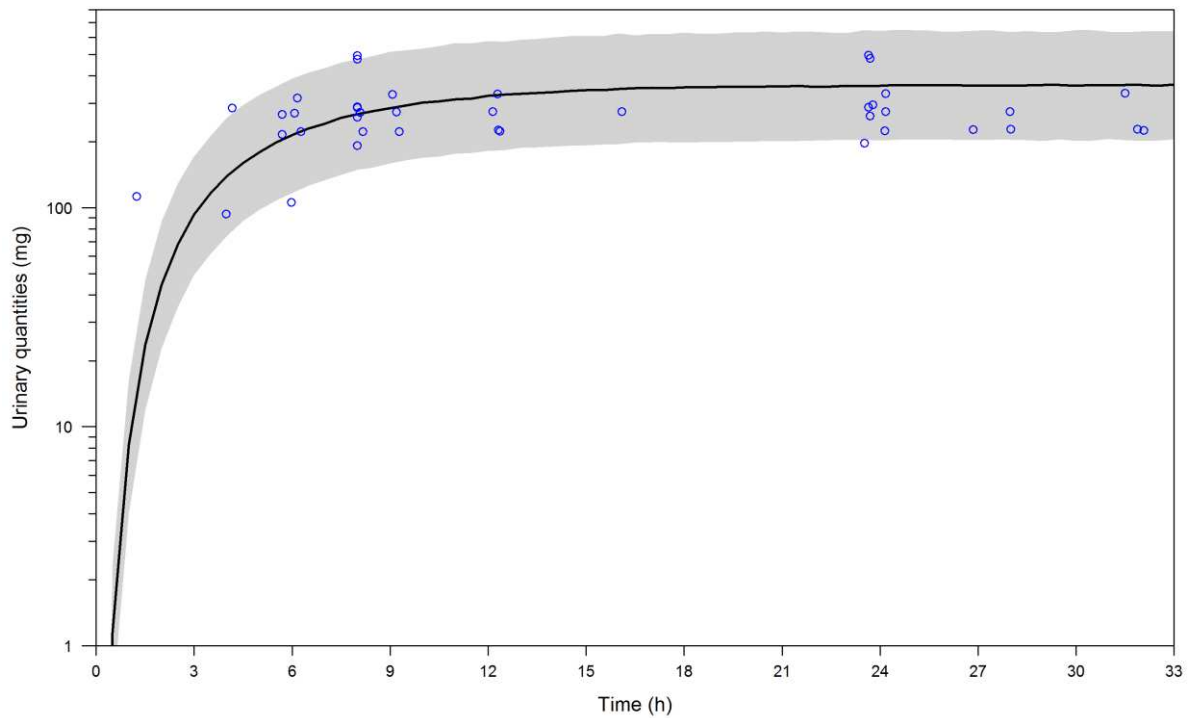


Figure 5: **Cumulative urinary data used for model calibration.**

VPC of the PBPK model for total urinary quantities concentrations after one IV of CMS.

Closed circles represent the observed plasma concentrations; the grey area represents the 90% prediction interval of the model, whereas the black solid line represents the median.

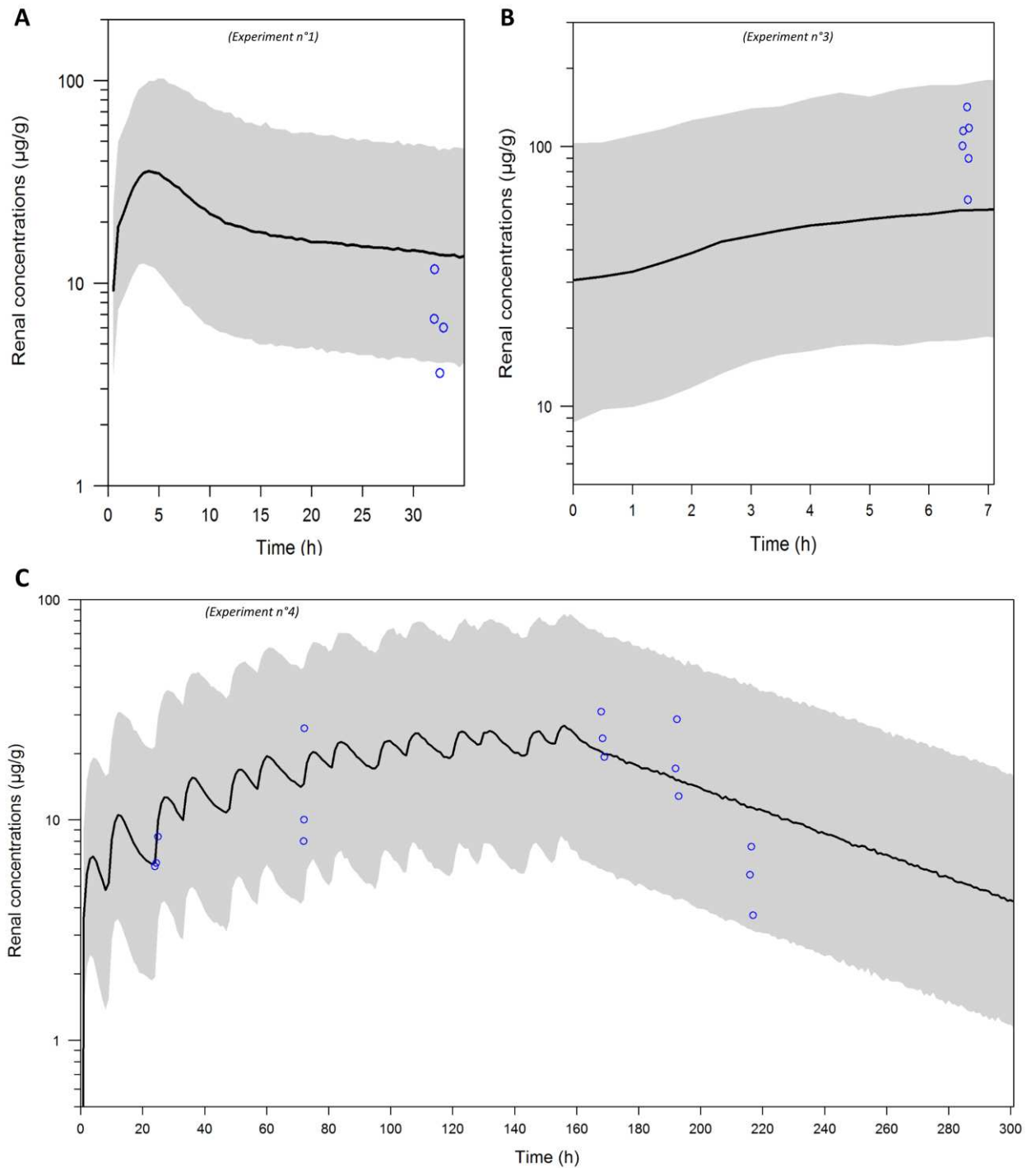


Figure 6: **Renal data used for model calibration.**

VPC of the PBPK model for total renal concentrations after one IV (A), the dosing scheme of infusions for steady-state (those pigs received one IV and one IM, 48h and 24h before $t=0$ h, respectively) (B) and repeated IM administrations (C) of CMS.

Closed circles represent the observed plasma concentrations; the grey areas represent the 90% prediction interval of the model, whereas the black solid line represents the median. No data were below the LOQ (0.15 µg/g).

To assess the PBPK model predictive ability, an external validation was performed with an independent dataset that was not used during model calibration. Plasmatic concentrations of both compounds were well predicted by the model (Fig. 7). For kidney, the elimination phase was in good match with observed data (Fig. 8) but the average model under-predicted the maximal concentrations in this organ. For other tissue concentrations, most of the observed data were below the LOQ for CMS and colistin (Supplementary files, Fig. S2 and S3). This was well predicted by the model except for CMS in muscles and colistin in skin. Overall, these results gave good confidence in the PBPK model predictive ability.

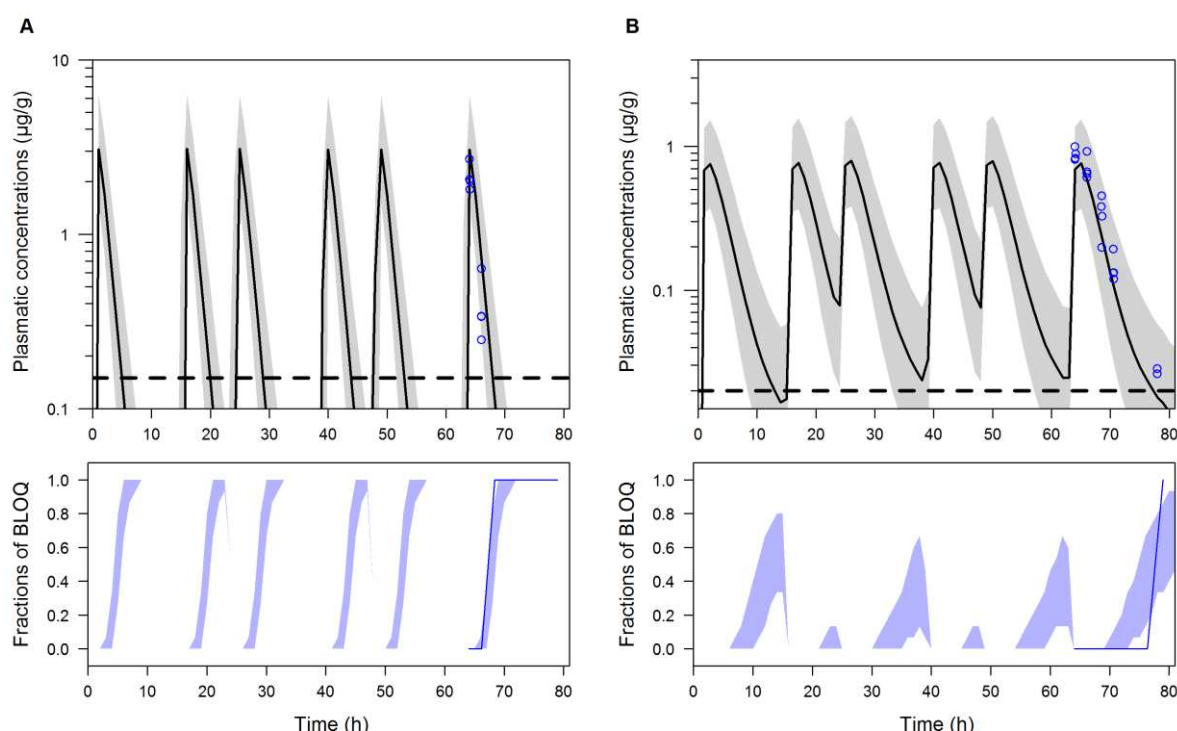


Figure 7: Plasmatic data used for model validation.

VPC of the PBPK model for CMS (A) and colistin (B) plasmatic concentrations after 3 days of IM administrations of CMS. Observed data come from an independent experiment that was not used for model calibration (experiment n°4).

Closed circles represent the observed plasma concentrations; the grey areas represent the 90% prediction interval of the model, whereas the black solid line represents the median; the horizontal dashed black lines represent the LOQs. In the smaller panels, blue areas represent the simulation-based 95% confidence intervals for the fraction of model simulated samples below the limit of quantification (BLOQ) at each time point, whereas the blue solid line represents the actual observed fraction of BLOQ samples.

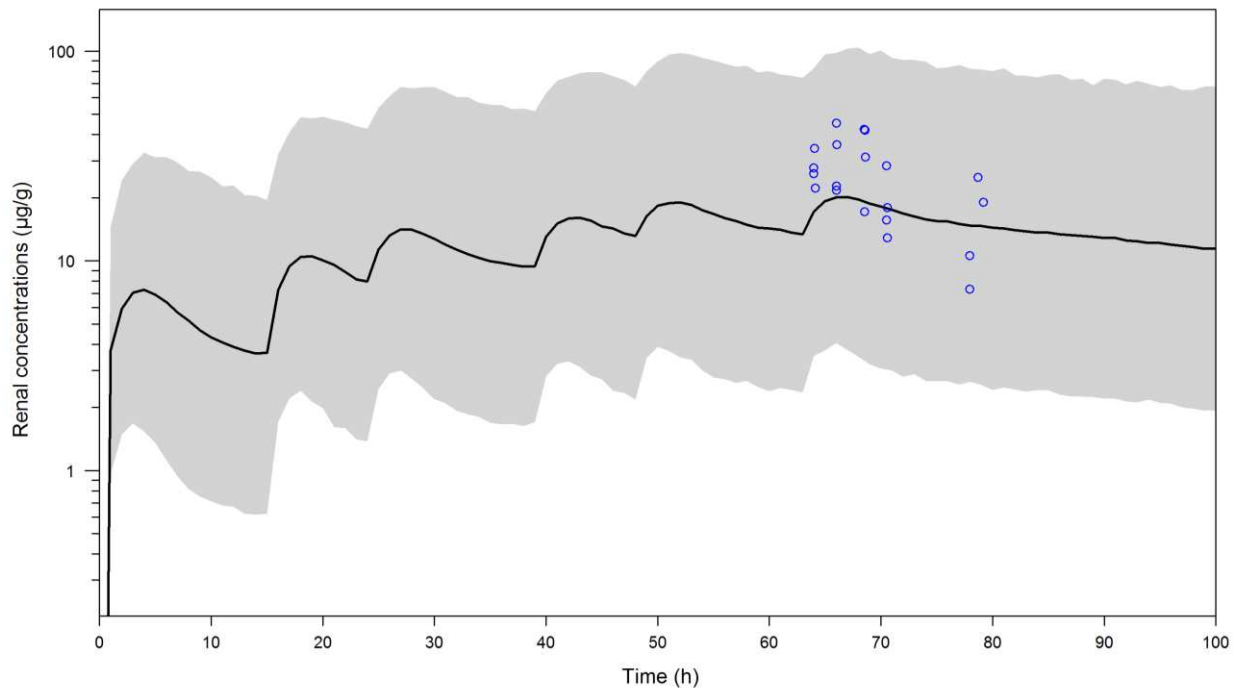


Figure 8: Renal data used for model validation

VPC of the PBPK model for total renal concentrations after 3 days of IM administrations of CMS. Observed data come from an independent experiment that was not used for model calibration (experiment n°4).

Closed circles represent the observed plasma concentrations; highlighted with grey are the areas between the 5th and 95th percentiles of model simulations, whereas the black solid line represents the median; No data were below the LOQ (0.15 µg/g).

- CMS and colistin pharmacokinetics in plasma and tissue

After IV and IM injection of CMS, CMS plasmatic concentrations declined quickly and were under the LOQ 8 h post-administration (Fig 3A and 3B). By contrast, colistin had a slower elimination and plasmatic concentrations were still quantifiable more than 24 h after CMS administration. The estimated half-life ($t_{1/2}$) of CMS was 1.2 h. For colistin, an initial half-life of distribution of 1.8 h was observed up to 10 h, followed by a terminal one of 10.5 h. This terminal $t_{1/2}$ for colistin was described in the model thanks to the additional vascular binding sites. The maximal concentrations of colistin were predicted to occur 1 h after the end of the IV infusion, or 2 h after IM injection. As shown by the median prediction in figure 4A, the plasmatic steady-state of CMS and colistin was achieved at the end of experiment n°3 for Kp determination. Concerning drug elimination, total CMS clearance was estimated to 11.6 L/h for a virtual pig of 50 kg, whose 7.9 L/h is renal clearance, which included the glomerular filtration, the tubular secretion and the CMS hydrolysis within kidneys. For colistin, the total clearance was found at 7.4 L/h whereas renal clearance was estimated at 1.5 L/h.

For tissues other than kidneys, all colistin K_p values were less than one (Table II) as well as the common estimated K_p for CMS (Table IV). In kidneys, the CMS concentrations are predicted to decrease quickly after an administration of CMS (Supplementary material, Fig. S4). Therefore, we can consider that there was only colistin for the late points after administration. Residual renal concentrations were still high 31 h after the single IV injection ($7.0 \pm 3.4 \mu\text{g/g}$, Fig. 6A) and 63 h after the last IM injection ($5.6 \pm 1.9 \mu\text{g/g}$, Fig. 6C), the terminal $t_{1/2}$ of colistin was estimated to be about 38 h. After the repeated IM injections over 7 days (experiment n°4, Fig. 6C), high renal concentrations at $24.6 \pm 5.9 \mu\text{g/g}$ were observed. A renal accumulation was observed with concentrations at $7.0 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$ and at $14.7 \pm 9.9 \mu\text{g/g}$ after one day (2 IM) and three days (6 IM) of treatment, respectively. The model predicts that steady-state in kidney should be almost reached after 5 days of treatment. The relative disposition of CMS and colistin within the kidneys as predicted by the PBPK model is represented on Figure 9. Typically, 68% of the initial dose is predicted to be excreted in urine as a mix of CMS and colistin, with 56% due to the net tubular secretion of CMS and only 12% due to the glomerular filtration of CMS. In urine, CMS accounted for more than 99% of the total quantities. Among the fraction of the CMS dose converted into colistin (32%), only 2% were converted into the kidney. Colistin extraction ratio in kidney would be 18%, with glomerular filtration of the unbound fraction in plasma, almost complete reabsorption (0.2% of formed colistin excreted in urine) and intracellular degradation in proximal tubules. Overall, kidneys would account for 20% of total colistin clearance.

For the other compartments, the evolution of the mass balance of CMS and colistin in each of them after one IV of CMS are represented in the supplementary materials (Fig. S5).

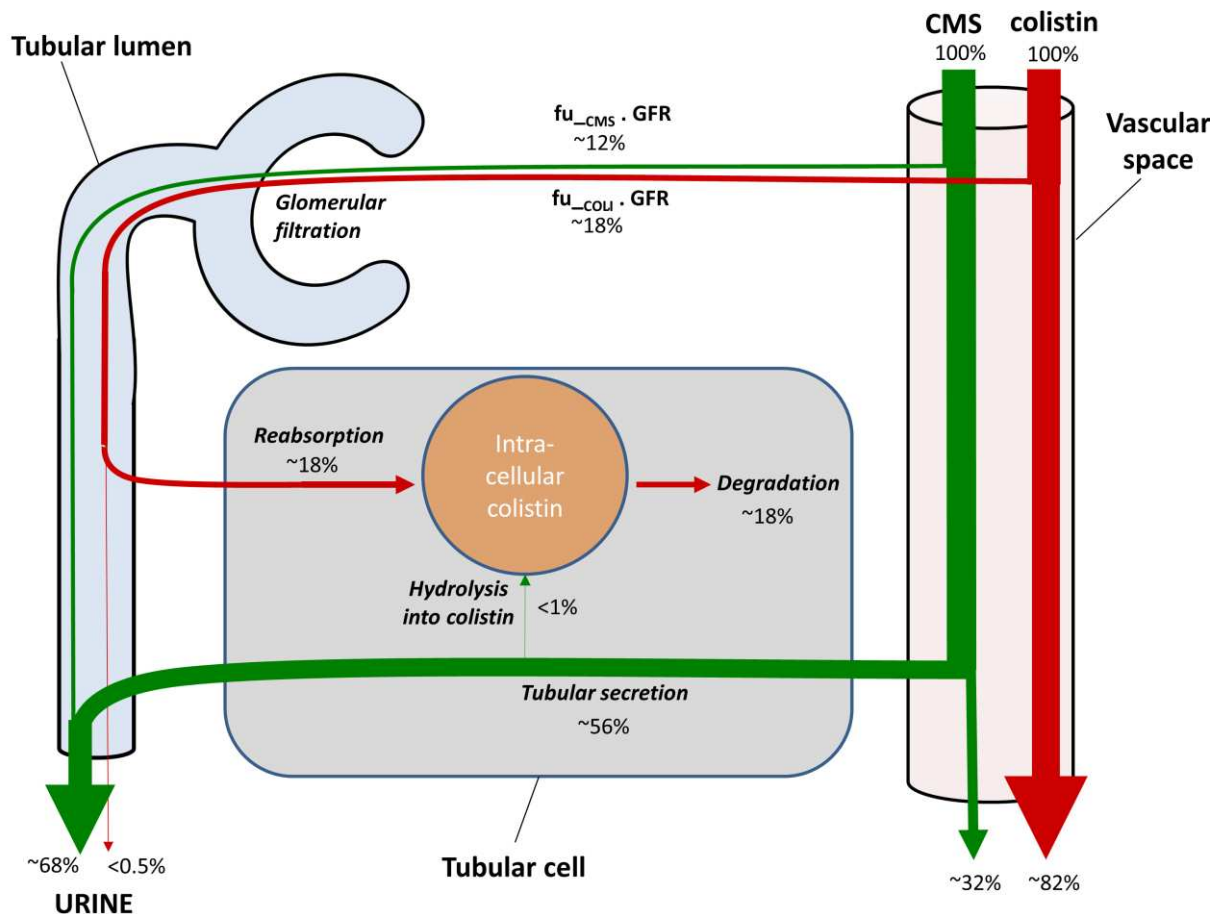


Figure 9: **CMS and colistin disposition within kidneys as given by the PBPK model.**

Each percentage represents the fraction of the initial dose (100%) involved in each process.

fu_CMS/COLI: unbound fraction of CMS/colistin; GFR: glomerular filtration rate

- Model application: withdrawal period estimation

The withdrawal period was calculated from concentrations in kidney because it is the organ where colistin remained the longest above the LMR. The simulation of the PBPK model gave a WP of 23 days for a virtual pig of 50 kg (Fig. 10) and 25 days for a virtual pig of 100 kg (Supplementary material, Fig. S6). The sensitivity analysis revealed 3 influential parameters on the time necessary to decrease below the MRL in kidney: K_{ON_COLI} , K_{OFF_COLI} and K_{deg_COLI} . The most important was K_{OFF_COLI} because a 10 % variation of its estimated value caused 8 % to 9 % of variation in the output (Table V).

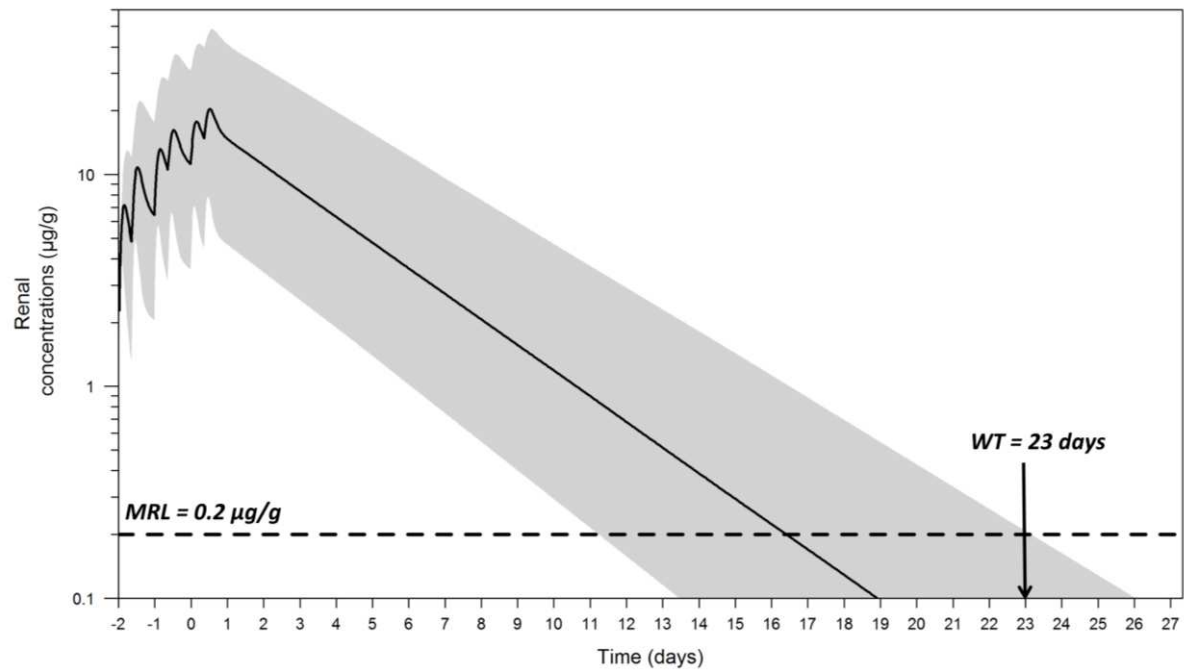


Figure 10: **Withdrawal period estimation in a 50-kg pig**

Model simulation in kidney after 3 consecutive day of CMS IM injections for a virtual pig of 50 kg.

The grey area includes the 1st and 99th percentiles of model simulations, whereas the black solid line represents the median; the horizontal dashed black line represents the kidney MRL for colistin (200 µg/kg).

WT: withdrawal time, rounded to the next whole day

Table V: Results of the local sensitivity analysis

Estimated parameters	Impact of a +10% in value on output ^a (in % of absolute variation)	Impact of a -10% in value on output ^a (in % of absolute variation)
CMS		
K_{hyd_CMS}	1.09	0.67
K_{IM_CMS}	0.22	0.40
Kp_{mix_CMS}	0.54	0.44
CL_{sec_CMS}	0.54	0.66
Colistin		
K_{deg_COLI}	4.59	5.45
K_{IM_COLI}	< 0.1	< 0.1
K_{BIND_COLI}	< 0.1	< 0.1
$K_{BIND_OUT_COLI}$	< 0.1	< 0.1
K_{ON_COLI}	2.95	3.50
K_{OFF_COLI}	8.29	9.05
CL_{reabs_COLI}	< 0.1	< 0.1

^aThe output is the time when the median model prediction of the kidney concentration crossed the corresponding MRL. In bold are the parameters that are the most influential for output. All parameters are detailed in Table III.

DISCUSSION

A whole body PBPK model was developed for colistin and the pro-drug, CMS, and was coupled with a nonlinear mixed effect modelling approach. This model gave excellent predictions of CMS and colistin concentrations in plasma (Fig. 7) and overall good ones for tissue concentrations, especially in kidneys (Fig. 8). For pigs, the PK of CMS in plasma was monophasic, with a $t_{1/2}$ of 1.2 h, whereas the PK of colistin was biphasic, with a distribution $t_{1/2}$ of 1.8 h and a terminal $t_{1/2}$ of 10.5 h, (Fig 3A and 3B).). These half-life in pigs were in good agreement with those in healthy volunteers (6) except that a monophasic elimination of colistin was described. However, this biphasic profile was also observed in sheep, another large-animal model (52). As colistin is known to non-specifically bind to biological and non-biological matrix (7, 53, 54), vascular “binding compartments” were implemented in the PBPK model to describe this late phase. A binding to erythrocytes or to the wall of vascular vessels is suggested as a physiological justification but evidences should be sought in experimental studies.

Concerning the distribution, the plasmatic unbound fraction of CMS was determined for the first time, thanks to an ultra-filtration method and by taking care of CMS degradation and potential adsorption to laboratory material. This value (37%) was close to that of colistin (40%) found in literature for pigs (25), highlighting a non-negligible protein binding. Colistin is known to bind to α -1-acid glycoprotein (at least for human) due to its cationic properties (55) but the mechanisms related to the protein binding of CMS has not been investigated yet. Regarding tissue distribution, all K_p values, experimental ones for colistin and estimated ones for CMS, were lower than 1. This result reflected a poor distribution into tissues that could be in accordance with an extracellular distribution of CMS and colistin within organs. Our values were in good agreement with the experimental K_p s determined in rats for colistin (18), suggesting that these values could be used for more extensive inter-species extrapolations of the distribution.

Concerning the elimination, CMS total clearance was higher (0.23 L/h/kg) than the colistin one (0.15 L/h/kg) for a standard pig weighting 50 kg. These results compared favourably with previous results in pigs (18). By contrast, these clearances are greater than those reported in healthy volunteers for CMS and colistin (0.12 L/h/kg and 0.040 L/h/kg for a man weighting 73 kg, respectively) (6), which is in contradiction with the classical allometry scaling laws based on weight (56). Therefore, extrapolation of clearances between the two species may be challenging.

To our knowledge, this is the first time that an accumulation of colistin in kidneys over time is quantified after repeated CMS administrations (50,000 UI/kg/day) over 7 days. Indeed, our colistin renal kinetic revealed more than a 3-fold increase in renal concentrations between the beginning and the end of the daily IM CMS injections (Fig. 6C). This is relation with the long $t_{1/2}$ of colistin estimated in this organ (~ 38 h). A previous study in rats already attested the high exposure of kidney to colistin: the ratio of the average kidney:plasma concentrations of colistin was 65.7 after 7 days of injections with colistin (57). However, the renal accumulation was not investigated.

To go further into the underlying mechanism of the renal disposition of CMS and colistin, we divided the kidney in physiological sub-compartments (Fig. 2) (43). The unbound fraction of CMS in plasma estimated herein implied a tubular secretion of CMS because glomerular filtration was insufficient to explain the quantities measured in urine (Fig. 2). According to our model, this tubular secretion was the major eliminating pathway of CMS in kidney, 4 to 5-fold higher than the glomerular filtration (Fig. 9). This net tubular secretion of CMS into urine was already supported by studies in rats (2) and suggested in humans (58), but as the unbound fraction of CMS in plasma was unknown, it remained hypothetical. The median proportion of the initial dose of CMS excreted in urine was predicted to be 68 %, in accordance with the 60 to 70 % of CMS dose recovered in urine in rats and human (2, 6).

Regarding colistin in kidney, the tubular reabsorption is known to be carrier-mediated thanks to PEPT2 and megalin (10, 14). In our model, the clearance of reabsorption from the tubular lumen (CL_{reabs_COLI}) was fixed to a physiological value estimated from data in man (6), due to identifiability problem. This reabsorption explained the colistin accumulation within tubular cells and the very small quantities of colistin excreted in urine. Colistin might also undergo a tubular secretion, as for CMS, but because of the predominant reabsorption, this was not identifiable by our model.

Several hypotheses were considered in the model to describe the colistin accumulation in kidney and its slow elimination in this organ. For instance, we tried to estimate a different colistin intrinsic constant of elimination (K_{deg_COLI}) in kidney, or to estimate a release of colistin from the kidneys towards the systemic circulation. However, these models did not improve the fitting or parameters were not identifiable. Moreover, the latter assumption, besides the modelling results, was also in contradiction with the results of previous studies showing *in vivo* that when the reabsorption of colistin or polymyxin B in renal tubules was inhibited, the renal exposures was reduced considerably but the kinetic profiles in plasma remained unaltered (10, 59). The fact that total clearance of polymyxin remained unchanged, whether the reabsorption was inhibited or not, suggested that polymyxin was eliminated within the kidney, either excreted in urine or degraded, but did not

go back within the systemic circulation. Finally, the use of a renal intracellular “binding” compartment, with a slow release, was the best choice for the goodness-of-fit and for physiological reasons. Indeed, the observed co-localisation with cell organelles (11) and the known non-specific binding properties of polymyxins to cellular membranes (1) could support this assumption. Sensitivity analysis suggested that these renal binding-specific parameters were the most influential in kidney exposure (Table V). This kind of intracellular binding has already been found in another PBPK model developed and validated for doxorubicin (belonging to an antitumor antibiotic family) (30). Furthermore, due to this intracellular accumulation, about 20 % of the total formed colistin quantities were predicted to be degraded within the kidneys, highlighting a major role of kidneys in colistin elimination. Further *in vitro* studies should be performed to investigate this intracellular binding and the intra-renal elimination.

These new renal data, CMS tubular secretion and colistin accumulation over time, may be useful to explore the nephrotoxicity associated to the use of CMS and colistin. Indeed, in a recent meta-analysis, nephrotoxicity ranged from 24% to 74% in CMS-treated patients but the majority of events were reversible (60). The duration therapy and the daily dose are risk factors of renal toxicity (1). In our study, the renal steady-state was quasi-achieved after 5 days of treatment (>120 h) and high renal concentrations were reached (>20 µg/g) (Fig. 6C). However, no clinical sign of renal insufficiency was observed in our animals and the creatinine concentrations in plasma stayed within the normal range over the whole treatment period (data not shown). Nevertheless, measurement of other biomarkers (like urinary creatinine or plasmatic cystatin C) might have been better to detect early signs of nephrotoxicity (61), in addition to histological analysis. According to the modeling results, the intra-renal conversion of CMS into colistin was very minor compared to the colistin that was reabsorbed and accumulated inside tubular cells. The accumulation of polymyxin inside proximal tubular cells is supposed to be responsible for the nephrotoxic effects involving apoptosis and oxidative stress (15, 16). Of note, a high amount of CMS (56% of initial dose) transited inside tubular cell. This is important as CMS (and its numerous partially methanesulfonated derivatives) is invoked as a potential contributor to the observed nephrotoxic effects (58). Nevertheless, this model could be refined when new data will be available

As a model application, we chose to estimate the withdrawal period (WP) after IM injections of CMS in pigs following the veterinarian recommended doses. WP is defined as the time after last administration for which 99 % of animals have residual edible tissue concentrations below the MRL, in Europe. Kidney was the tissue of interest because of the accumulation and of the slow

colistin depletion (Fig. 8), compared to all other edible tissues (Supplementary files, Fig. S2 and S3). Simulations from the PBPK model gave an estimated WP of 23 days for a 50-kg pig. Since our last experimental concentration was measured 3 days after last administration, further experimental data around the estimated WP would have been preferable to confirm it. However, we are confident in this result as our estimated WP was close to the official one given in the summary of product characteristics of the vet speciality (21 days). The renal accumulation observed in our repeated CMS injections experiment highlighted that an extra label use of CMS would probably need longer WP. No data of such use for colistin are currently recorded but the use of PBPK model in these extra label situations had already proved their benefit (62). Furthermore, this PBPK model was developed with colistin and its prodrug CMS but it could be easily adapted to pigs injected directly with colistin, as it can be done in veterinary medicine (63).

To our knowledge, this is the first study using a NLME approach for a PBPK model related to withdrawal period calculation. The process of PBPK models development for food safety is well established as explained in a recent review of veterinary pharmacology (23). This method allows to simulate the time course and predict the concentration of drugs in any tissue of interest. Different doses and route of administrations can be used to develop a PBPK model as we did, enhancing its strength for prediction (23). The classical statistical methodology for WP estimation uses inferences on a limited number of healthy animals whereas the real-life target is diseased animals. We also used healthy animals but the PBPK model can easily handle patho-physiological changes of parameters, like for a diseased animal, to see the effect on tissue drug concentrations. In addition, the use of NLME modelling brings many advantages. Noticeably, it gives robust estimation of population variabilities like inter-individual variability which is discriminated from the unexplained but quantified residual variability. This is important as the WP calculation applies for a global “population of treated animals” and must include 99% of them. This approach is also efficient to handle sparse data (like in experiment n°4) and thus could limit the number of necessary animals. Furthermore, this approach (NLME) allows a sophisticated handling of data below the limit of quantification compared the classic one. Indeed, in the latter approach, the rule is to omit or fix the data BLOQ at half of the LOQ but it could bias the results (22).

Lastly, it is necessary to highlight some analytical considerations. Due to the high instability of CMS, direct measure of its concentration is not possible (26). The indirect method used could not discriminate renal CMS and colistin concentrations, which were pooled. Therefore, the estimations of parameters in kidney might have been biased. Moreover, CMS is actually a mixture of many methanesulfonated derivatives carrying various number of methanesulfonate groups (3). It is not

possible to determine the concentration of each component separately; therefore, all these derivatives were considered as being CMS. As previously explained, colistin (which has no methanesulfonate group) is widely reabsorbed, whereas CMS (which have 5 methanesulfonate groups) is not. Therefore, some partially methanesulfonated derivatives, *i.e.* CMS, might also be reabsorbed. These compounds may have an ADME closer to colistin than to CMS. All these concerns highlight the need of further analytical developments allowing to discriminate CMS and colistin in kidneys and to quantify the various methanesulfonate derivatives.

CONCLUSION

To conclude, this PBPK model coupled with a NMLE approach gave new insight into the mechanistic pharmacokinetics of CMS and colistin, especially within kidneys. This may have implication to limit the colistin induced-nephrotoxicity in human medicine. We also used this model to estimate withdrawal period in pigs treated with CMS, highlighting the utility of such approach in veterinary medicine. Furthermore, PBPK models are helpful to perform inter-species extrapolation (from animal to human), but also intra-specie extrapolation (from adult to children). Thus, this model could be a good basis to adapt CMS dosing-regimen in pediatric population, a sub-population which is less studied. Some works about this topic are ongoing in our team.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figures

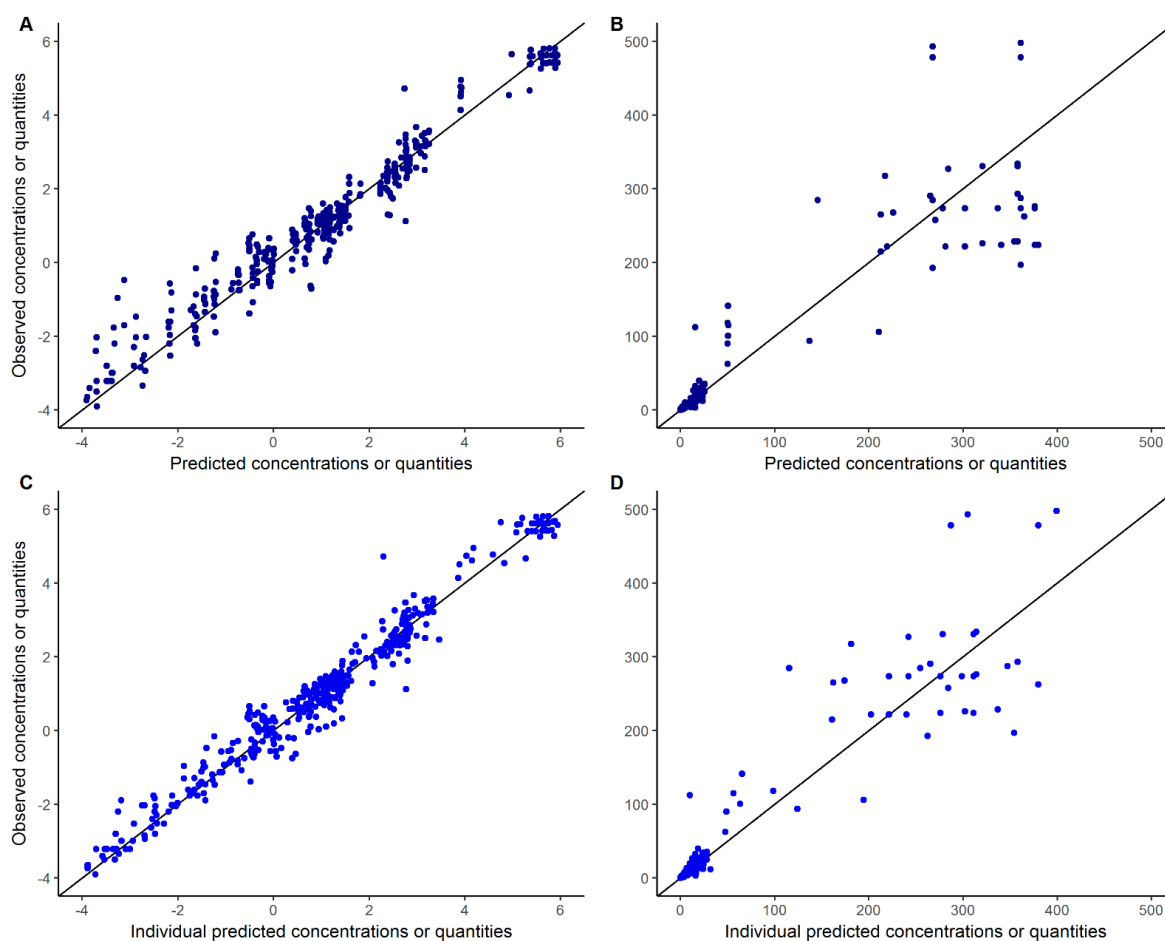


Figure S1 : Goodness-of-fit plots for model validation

Population predicted (PRED) versus observed concentrations or quantities (DV) in log-log scale (A) and linear scale (B).

Individual predicted (PRED) versus observed concentrations or quantities (DV) in log-log scale (C) and linear scale (D).

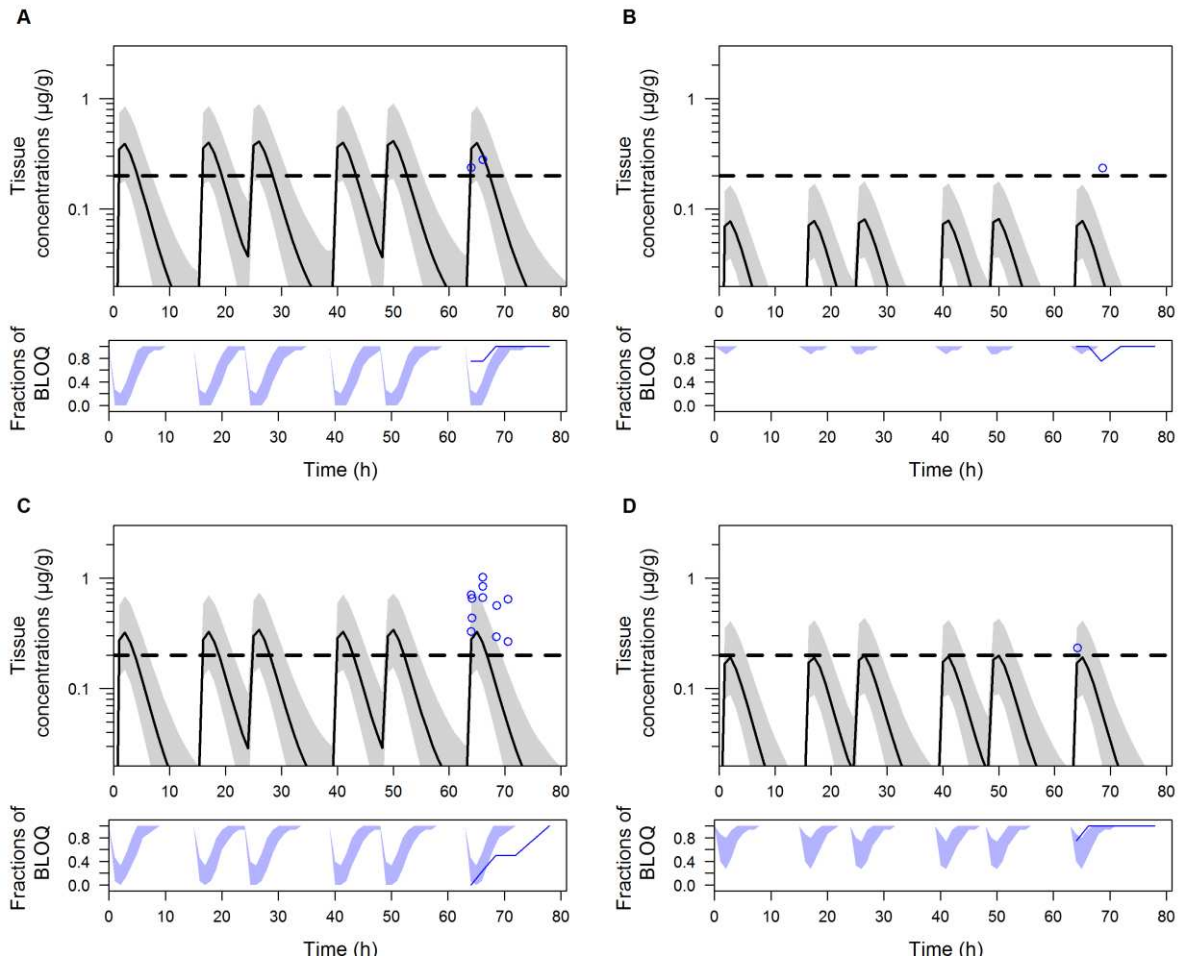


Figure S2 : Colistin tissue data used for model validation

VPC of the PBPK model for colistin concentrations in liver (A), muscles (B), skin (C), fat (D) after 3 days of IM administrations of CMS. Observed data come from an independent experiment that was not used for model calibration (experiment n°5).

Closed circles represent the observed tissue concentrations; highlighted with grey are the areas between the 5th and 95th percentiles of model simulations, whereas the black solid line represents the median; the horizontal dashed black line represents the limit of quantification. In the lower panels, blue areas represent the simulation-based 95% confidence intervals for the fraction of data below the limit of quantification (BLOQ), whereas the blue solid line represents the actual observed fraction of BLOQ samples.

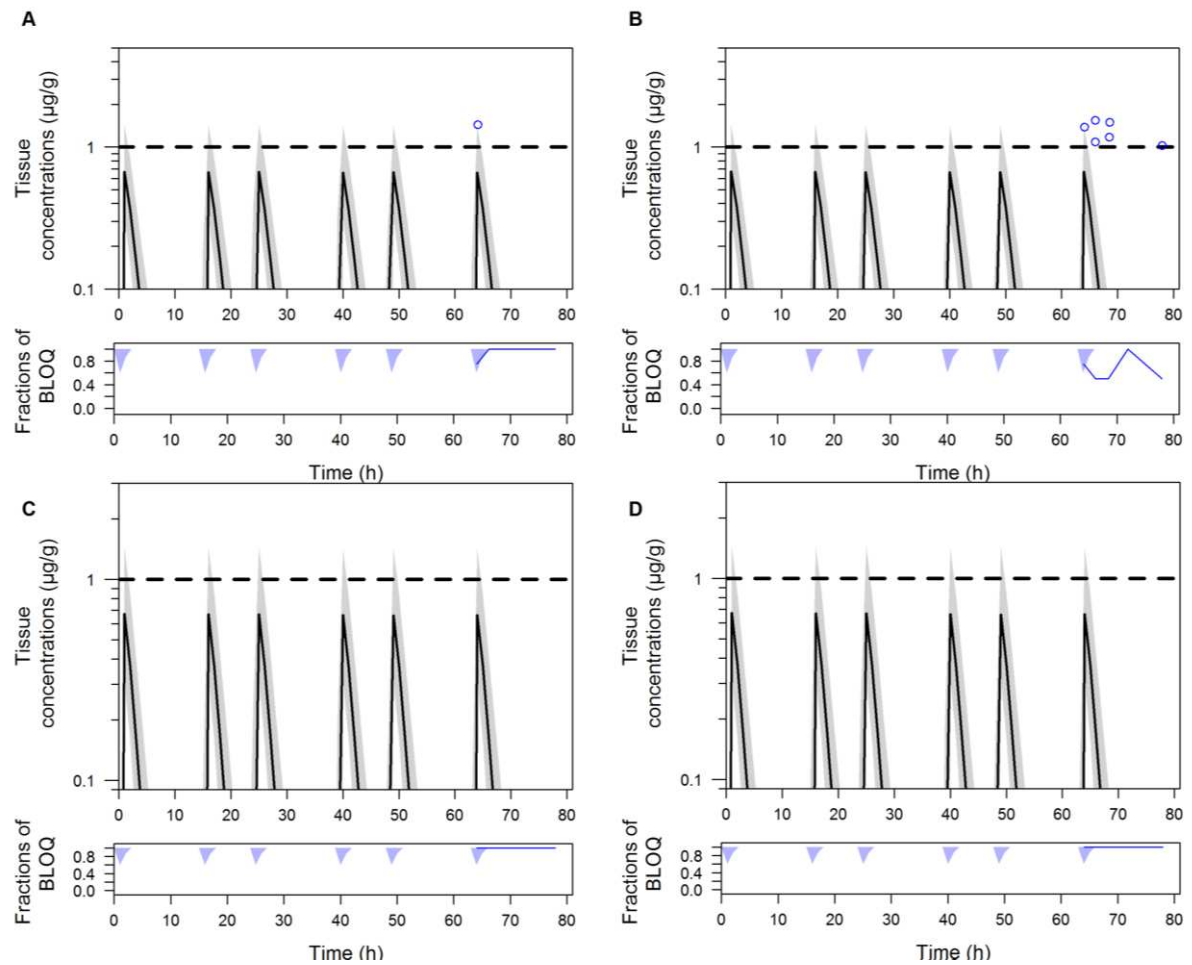


Figure S3: CMS tissue data used for model validation

VPC of the PBPK model for CMS concentrations in liver (A), muscles (B), skin (C), fat (D) after 3 days of IM administrations of CMS. Observed data come from an independent experiment that was not used for model calibration (experiment n°5).

Closed circles represent the observed tissue concentrations; highlighted with grey are the areas between the 5th and 95th percentiles of model simulations, whereas the black solid line represents the median; the horizontal dashed black line represents the limit of quantification. In the lower panels, blue areas represent the simulation-based 95% confidence intervals for the fraction of data below the limit of quantification (BLOQ), whereas the blue solid line represents the actual observed fraction of BLOQ samples.

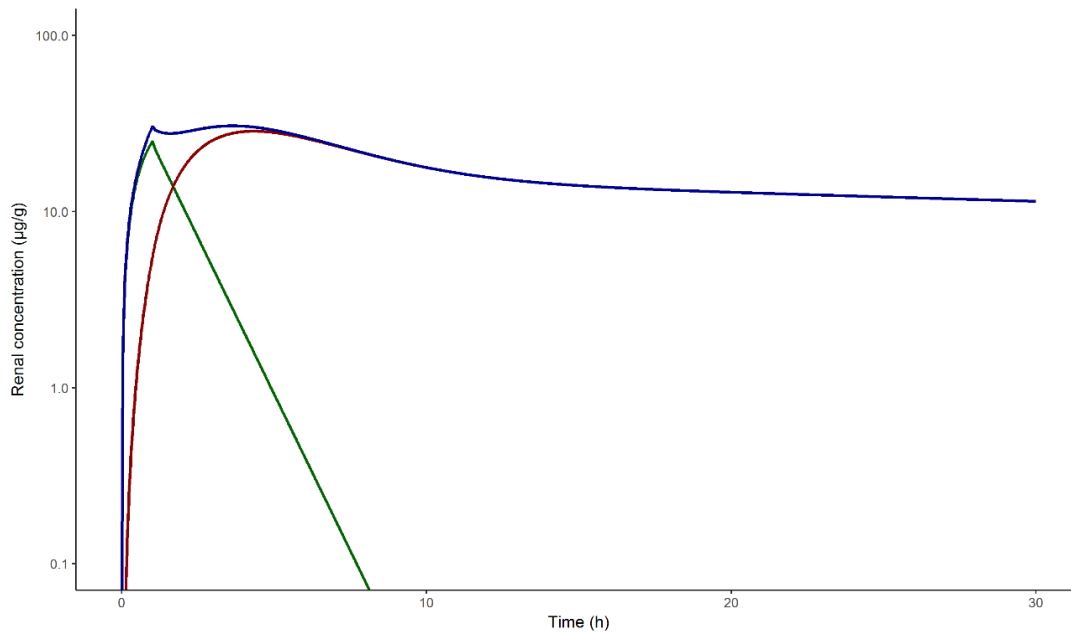


Figure S4: **Relative contribution of CMS and colistin in total kidney concentrations.**

CMS concentrations (green), colistin concentrations (red) and total concentrations in kidney after one IV of CMS (10 mg/kg) for a 50-kg pig.

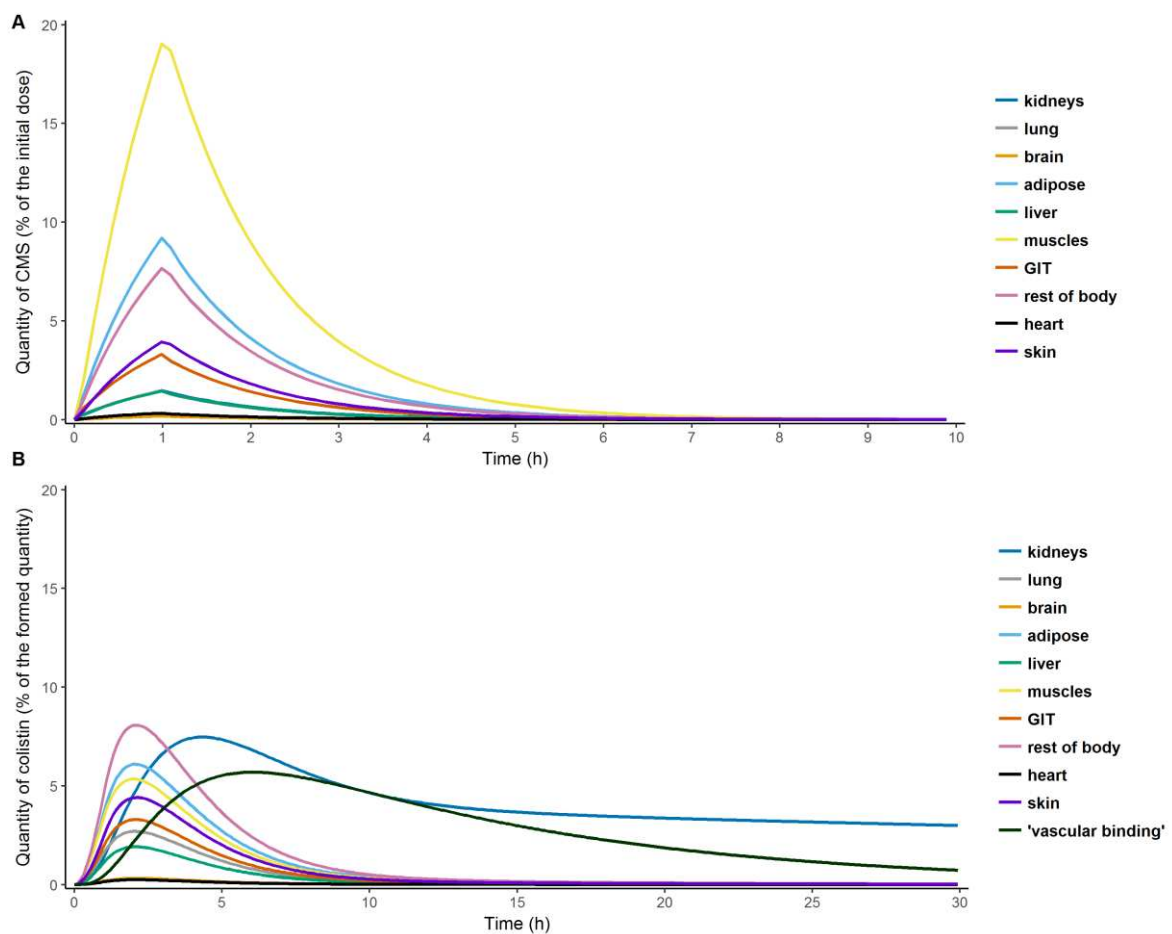


Figure S5: **Evolution of the mass balance predicted by the model after one IV of CMS, as expressed in relative quantities for CMS (A) and colistin (B) in each compartment.**

GIT: gastro-intestinal tract

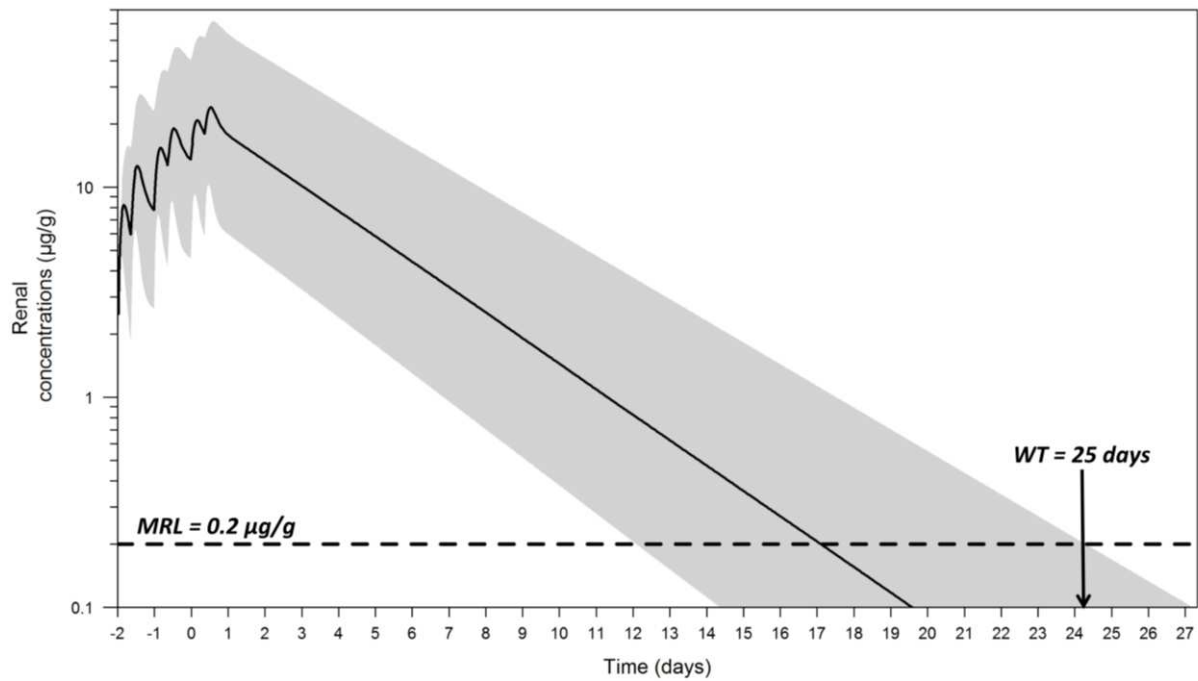


Figure S6: Withdrawal period estimation in a 100-kg pig

Model simulation in kidney after 3 consecutive day of CMS IM injections for a virtual pig of 100 kg.

The grey area includes the 1st and 99th percentiles of model simulations, whereas the black solid line represents the median; the horizontal dashed black line represents the kidney MRL (200 µg/kg).

WT: withdrawal time, rounded to the next whole day

Differential equations of the mass transfers in the PBPK model

- Generic equations for CMS (Eq. 1) and colistin (Eq. 2) in tissue (except vascular, lung and kidney compartments)

$$\frac{dA_{tissue_CMS}}{dt} = Q_{tissue} \cdot (C_{art_CMS} - \frac{C_{tissue_CMS}}{Kp_{tissue_CMS}}) - C_{tissue_CMS} \cdot CL_{hyd_CMS} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\frac{dA_{tissue_COLI}}{dt} = Q_{tissue} \cdot (C_{art_COLI} - \frac{C_{tissue_COLI}}{Kp_{tissue_COLI}}) - C_{tissue_COLI} \cdot CL_{deg_COLI} + C_{tissue_CMS} \cdot CL_{hyd_CMS} \cdot RPM \quad (\text{Eq. 2})$$

- Equations for CMS and colistin in veins (Eq. 3-4), arteries (Eq. 5-6), vascular binding compartments (Eq. 7-8) and lungs (Eq. 9-10)

$$\frac{dA_{vein_CMS}}{dt} = \sum(Q_{tissue} \cdot \frac{C_{tissue_CMS}}{Kp_{tissue_CMS}}) - C_{vein_CMS} \cdot CL_{hyd_vein_CMS} + K_{IM_CMS} \cdot A_{IM_depot_CMS} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\begin{aligned} \frac{dA_{vein_COLI}}{dt} = & \sum(Q_{tissue} \cdot \frac{C_{tissue_COLI}}{Kp_{tissue_COLI}}) + C_{vein_CMS} \cdot CL_{hyd_vein_CMS} \cdot RPM - C_{vein_COLI} \cdot CL_{deg_vein_COLI} + K_{IM_COLI} \cdot A_{IM_depot_COLI} - \\ & K_{BIND_COLI} \cdot A_{vein_COLI} + K_{BIND_OUT_COLI} \cdot A_{vein_BIND_COLI} \quad (\text{Eq. 4}) \end{aligned}$$

$$\frac{dA_{art_CMS}}{dt} = CO \cdot (\frac{C_{lung_CMS}}{Kp_{lung_CMS}} - C_{art_CMS}) - C_{art_CMS} \cdot CL_{hyd_art_CMS} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\begin{aligned} \frac{dA_{art_COLI}}{dt} = & CO \cdot (\frac{C_{lung_COLI}}{Kp_{lung_COLI}} - C_{art_COLI}) - C_{art_COLI} \cdot CL_{hyd_art_COLI} + C_{art_CMS} \cdot CL_{hyd_art_CMS} \cdot RPM - C_{art_COLI} \cdot CL_{deg_art_COLI} - \\ & K_{BIND_COLI} \cdot A_{art_COLI} + K_{BIND_OUT_COLI} \cdot A_{art_BIND_COLI} \quad (\text{Eq. 6}) \end{aligned}$$

$$\frac{dA_{vein_BIND_COLI}}{dt} = K_{BIND_COLI} \cdot A_{vein_COLI} - K_{BIND_OUT_COLI} \cdot A_{vein_BIND_COLI} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\frac{dA_{art_BIND_COLI}}{dt} = K_{BIND_COLI} \cdot A_{art_COLI} - K_{BIND_OUT_COLI} \cdot A_{art_BIND_COLI} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\frac{dA_{lung_CMS}}{dt} = CO \cdot (C_{ven_CMS} - \frac{C_{lung_CMS}}{Kp_{lung_CMS}}) - C_{lung_CMS} \cdot CL_{hyd_lung_CMS} \quad (Eq. 9)$$

$$\frac{dA_{lung_COLI}}{dt} = CO \cdot (C_{ven_COLI} - \frac{C_{lung_COLI}}{Kp_{lung_COLI}}) - C_{lung_COLI} \cdot CL_{deg_lung_COLI} + C_{lung_CMS} \cdot CL_{hyd_CMS} \cdot RPM \quad (Eq. 10)$$

- Equations for CMS and colistin in the renal sub-compartments: vascular (Eq. 11-12), extra-vascular (Eq. 13-14), intracellular (Eq. 15-16), binding (Eq. 17), tubules (Eq. 18-19) and in bladder (Eq. 20-21) and urine (Eq. 22-23)

$$\frac{dA_{kid_VA_CMS}}{dt} = Q_{kid} \cdot (C_{art_CMS} - C_{kid_VA_CMS}) - C_{kid_VA_CMS} \cdot CL_{hyd_kid_VA_CMS} \quad (Eq. 11)$$

$$\frac{dA_{kid_VA_COLI}}{dt} = Q_{kid} \cdot (C_{art_COLI} - C_{kid_VA_COLI}) - C_{kid_VA_COLI} \cdot CL_{deg_kid_VA_COLI} + C_{kid_VA_CMS} \cdot CL_{hyd_kid_VA_CMS} \cdot RPM \quad (Eq. 12)$$

$$\frac{dA_{kid_EV_CMS}}{dt} = (Q_{kid} - CL_{GFR_CMS}) \cdot C_{kid_VA_CMS} - Q_{kid} \cdot C_{kid_EV_CMS} - C_{kid_EV_CMS} \cdot (CL_{hyd_kid_EV_CMS} + CL_{sec_CMS}) \quad (Eq. 13)$$

$$\frac{dA_{kid_EV_COLI}}{dt} = (Q_{kid} - CL_{GFR_COLI}) \cdot C_{kid_VA_COLI} - Q_{kid} \cdot C_{kid_EV_COLI} - C_{kid_EV_COLI} \cdot CL_{deg_kid_EV_COLI} + C_{kid_EV_CMS} \cdot CL_{hyd_kid_EV_CMS} \cdot RPM \quad (Eq. 14)$$

$$\frac{dA_{kid_IC_CMS}}{dt} = C_{kid_EV_CMS} \cdot CL_{sec_CMS} - C_{kid_IC_CMS} \cdot (CL_{hyd_kid_IC_CMS} + CL_{sec_CMS}) \quad (Eq. 15)$$

$$\frac{dA_{kid_IC_COLI}}{dt} = C_{kid_TUB_COLI} \cdot CL_{reabs_COLI} - C_{kid_IC_COLI} \cdot CL_{deg_kid_IC_COLI} + C_{kid_IC_CMS} \cdot CL_{hyd_kid_IC_CMS} \cdot RPM - K_{ON_COLI} \cdot A_{kid_IC_COLI} + K_{OFF_COLI} \cdot A_{kid_BIND_COLI} \quad (Eq. 16)$$

$$\frac{dA_{kid_BIND_COLI}}{dt} = K_{ON_COLI} \cdot A_{kid_IC_COLI} - K_{OFF_COLI} \cdot A_{kid_BIND_COLI} \quad (Eq. 17)$$

$$\frac{dA_{kid_TUB_CMS}}{dt} = CL_{GFR_CMS} \cdot C_{kid_VA_CMS} - C_{kid_TUB_CMS} \cdot (CL_{HYD_kid_TUB_CMS} + Q_{tub}) + C_{kid_IC_CMS} \cdot CL_{sec_CMS} \quad (\text{Eq. 18})$$

$$\frac{dA_{kid_TUB_COLI}}{dt} = CL_{GFR_COLI} \cdot C_{kid_VA_COLI} - C_{kid_TUB_COLI} \cdot (CL_{deg_kid_TUB_COLI} + CL_{reabs_COLI} + Q_{tub}) \quad (\text{Eq. 19})$$

$$\frac{dA_{Bladder_CMS}}{dt} = C_{kid_TUB_CMS} \cdot Q_{tub} - C_{Bladder_CMS} \cdot Q_{uri} \quad (\text{Eq. 20})$$

$$\frac{dA_{Bladder_COLI}}{dt} = C_{kid_TUB_COLI} \cdot Q_{tub} - C_{Bladder_COLI} \cdot Q_{uri} \quad (\text{Eq. 21})$$

$$\frac{dCMS_{urine}}{dt} = C_{Bladder_CMS} \cdot Q_{uri} \quad (\text{Eq. 22})$$

$$\frac{dCOLI_{urine}}{dt} = C_{Bladder_COLI} \cdot Q_{uri} \quad (\text{Eq. 23})$$

- Equations for CMS and colistin in intra-muscular depot compartment (Eq. 24-25)

$$\frac{dCMS_{IM_depot}}{dt} = -K_{IM_CMS} \cdot A_{IM_CMS} - K_{hyd_CMS} \cdot A_{IM_depot_CMS} \quad (\text{Eq. 24})$$

$$\frac{dCOLI_{IM_depot}}{dt} = -K_{IM_COLI} \cdot A_{IM_COLI} - K_{deg_COLI} \cdot A_{IM_depot_COLI} + K_{hyd_CMS} \cdot A_{IM_depot_CMS} \quad (\text{Eq. 25})$$

With A_{x_CMS} : CMS amount in tissue x ; A_{x_COLI} : colistin amount in tissue x ; Q_x : blood or urine flow in tissue x ; C_{x_CMS} : CMS concentration in tissue x ; C_{x_COLI} : colistin concentration in tissue x ; $CL_{HYD_x_CMS}$: intrinsic hydrolysis clearance of CMS in tissue x ; $CL_{deg_x_COLI}$: intrinsic eliminating clearance of colistin in tissue x ; K_{BIND_COLI} and $K_{BIND_OUT_COLI}$: first-order constant transfer between vascular and binding compartments ; K_{ON_COLI} and K_{OFF_COLI} : first-order constant transfer between renal intracellular and binding sub-compartments; CL_{GFR_CMS} : CMS clearance by glomerular filtration; CL_{GFR_COLI} : colistin clearance by glomerular filtration; RPM: ratio of molecular weight of CMS and colistin ; CO : cardiac output corrected by haematocrit to get plasmatic flow

Tissue abbreviations: kid: kidney; Tub: tubules; VA: vascular; EV: extra-vascular; IC: intra-cellular; bind: binding compartment

REFERENCES

1. Gregoire N, Aranzana-Climent V, Magreault S, Marchand S, Couet W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clinical pharmacokinetics*. 2017.
2. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC, Coulthard K. Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2004;53(5):837-40.
3. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K. Stability of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Aqueous Media and Plasma as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(4):1364-70.
4. Forrest A, Garonzik SM, Thamlikitkul V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Paterson DL, Li J, et al. Pharmacokinetic/toxicodynamic analysis of colistin-associated acute kidney injury in critically ill patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;AAC. 01367-17.
5. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;25(1):11-25.
6. Couet W, Gregoire N, Gobin P, Saulnier P, Frasca D, Marchand S, et al. Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2011;89(6):875-9.
7. Craig WA, Kunin CM. Dynamics of binding and release of the polymyxin antibiotics by tissues. *J Pharmacol Exp Ther*. 1973;184(3):757-65.
8. Tomasi L, Giovannetti L, Rondolotti A, Rocca GD, Stracciari GL. Depletion of the residues of colistin and amoxicillin in Turkeys following simultaneous subcutaneous administration. *Veterinary research communications*. 1996;20(2):175-82.
9. Ma Z, Wang J, Nation RL, Li J, Turnidge JD, Coulthard K, et al. Renal disposition of colistin in the isolated perfused rat kidney. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(7):2857-64.
10. Suzuki T, Yamaguchi H, Ogura J, Kobayashi M, Yamada T, Iseki K. Megalin contributes to kidney accumulation and nephrotoxicity of colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(12):6319-24.
11. Yun B, Azad MA, Nowell CJ, Nation RL, Thompson PE, Roberts KD, et al. Cellular uptake and localization of polymyxins in renal tubular cells using rationally designed fluorescent probes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(12):7489-96.
12. Azad MA, Roberts KD, Yu HH, Liu B, Schofield AV, James SA, et al. Significant accumulation of polymyxin in single renal tubular cells: a medicinal chemistry and triple correlative microscopy approach. *Analytical chemistry*. 2015;87(3):1590-5.
13. Yun B, Azad MA, Wang J, Nation RL, Thompson PE, Roberts KD, et al. Imaging the distribution of polymyxins in the kidney. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;dku441.
14. Lu X, Chan T, Xu C, Zhu L, Zhou QT, Roberts KD, et al. Human oligopeptide transporter 2 (PEPT2) mediates cellular uptake of polymyxins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015.
15. Dai C, Li J, Tang S, Li J, Xiao X. Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):4075-85.
16. Azad MA, Akter J, Rogers K, Nation RL, Velkov T, Li J. Major pathways of polymyxin-induced apoptosis in rat kidney proximal tubular cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015.

17. Nestorov I. Whole-body physiologically based pharmacokinetic models. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2007;3(2):235-49.
18. Bouchene S. Physiologically Based Pharmacometric Models for Colistin and the Immune Response to Bacterial Infection: Acta Universitatis Upsaliensis; 2016.
19. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. 1981;9(5):635-51.
20. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Frazier KS. Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. Veterinary Pathology Online. 2012;49(2):344-56.
21. JECFA. Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 66th Meeting 2006: Food & Agriculture Org.; 2006.
22. EMA. Guideline on approach towards harmonisation of withdrawal periods. European Medicines Agency (EMA) - Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP), 2016 EMA/CVMP/CHMP/231573/2016 Contract No.: EMA/CVMP/SWP/735325/2012.
23. Lin Z, Gehring R, Mochel J, Lavé T, Riviere J. Mathematical modeling and simulation in animal health—Part II: principles, methods, applications, and value of physiologically based pharmacokinetic modeling in veterinary medicine and food safety assessment. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. 2016;39(5):421-38.
24. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, et al. Consistent Global Approach on Reporting of Colistin Doses to Promote Safe and Effective Use. Clinical Infectious Diseases. 2014;58(1):139-41.
25. Rottbøll LAH, Friis C. Penetration of antimicrobials to pulmonary epithelial lining fluid and muscle and impact of drug physicochemical properties determined by microdialysis. Journal of pharmacological and toxicological methods. 2016;78:58-65.
26. Gobin P, Lemaître F, Marchand S, Couet W, Olivier J-C. Assay of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Plasma and Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010;54(5):1941-8.
27. Buur JL, Baynes RE, Craigmill AL, Riviere JE. Development of a physiologic-based pharmacokinetic model for estimating sulfamethazine concentrations in swine and application to prediction of violative residues in edible tissues. American journal of veterinary research. 2005;66(10):1686-93.
28. Chen K, Seng KY. Calibration and validation of a physiologically based model for soman intoxication in the rat, marmoset, guinea pig and pig. Journal of applied toxicology : JAT. 2012;32(9):673-86.
29. de Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolfram S, Alink GM, et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. The Journal of nutrition. 2005;135(7):1718-25.
30. Dubbelboer IR, Lilienberg E, Sjögren E, Lennernas H. A model-based approach to assessing the importance of intracellular binding sites in doxorubicin disposition. Molecular Pharmaceutics. 2017;14(3):686-98.
31. Elowsson P, Carlsten J. Body composition of the 12-week-old pig studied by dissection. Laboratory animal science. 1997;47(2):200-2.
32. Eskild-Jensen A, Jacobsen L, Christensen H, Frokiaer J, Jorgensen HS, Djurhuus JC, et al. Renal function outcome in unilateral hydronephrosis in newborn pigs. II. Function and volume of contralateral kidneys. J Urol. 2001;165(1):205-9.

33. Lødrup AB, Karstoft K, Dissing TH, Nyengaard JR, Pedersen M. The association between renal function and structural parameters: a pig study. *BMC Nephrology*. 2008;9:18-.
34. Lundeen G, Manohar M, Parks C. Systemic distribution of blood flow in swine while awake and during 1.0 and 1.5 MAC isoflurane anesthesia with or without 50% nitrous oxide. *Anesthesia and analgesia*. 1983;62(5):499-512.
35. Rendas A, Branthwaite M, Reid L. Growth of pulmonary circulation in normal pig--structural analysis and cardiopulmonary function. *Journal of Applied Physiology*. 1978;45(5):806-17.
36. Scotcher D, Jones C, Posada M, Rostami-Hodjegan A, Galetin A. Key to Opening Kidney for In Vitro-In Vivo Extrapolation Entrance in Health and Disease: Part I: In Vitro Systems and Physiological Data. *The AAPS journal*. 2016;18(5):1067-81.
37. Suenderhauf C, Parrott N. A physiologically based pharmacokinetic model of the minipig: data compilation and model implementation. *Pharmaceutical research*. 2013;30(1):1-15.
38. Ten have GAM, Bost MCF, Suyk-Wierts JCAW, van den Bogaard AEJM, Deutz NEP. Simultaneous measurement of metabolic flux in portally-drained viscera, liver, spleen, kidney and hindquarter in the conscious pig. *Laboratory Animals*. 1996;30(4):347-58.
39. Tranquilli WJ, Manohar M, Parks CM, Thurmon JC, Theodorakis MC, Benson GJ. Systemic and regional blood flow distribution in unanesthetized swine and swine anesthetized with halothane + nitrous oxide, halothane, or enflurane. *Anesthesiology*. 1982;56(5):369-79.
40. Upton RN. Organ weights and blood flows of sheep and pig for physiological pharmacokinetic modelling. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2008;58(3):198-205.
41. Vinegar A. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for the anesthetics halothane, isoflurane, and desflurane in the pig (*Sus scrofa*). DTIC Document, 1999.
42. Drougas JG, Barnard SE, Wright JK, Sika M, Lopez RR, Stokes KA, et al. A model for the extended studies of hepatic hemodynamics and metabolism in swine. *Laboratory animal science*. 1996;46(6):648-55.
43. Peters SA. Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulations: principles, methods, and applications in the pharmaceutical industry: John Wiley & Sons; 2012.
44. Scotcher D, Jones C, Rostami-Hodjegan A, Galetin A. Novel minimal physiologically-based model for the prediction of passive tubular reabsorption and renal excretion clearance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;94:59-71.
45. Leavens T, Tell L, Clothier K, Griffith R, Baynes RE, Riviere J. Development of a physiologically based pharmacokinetic model to predict tulathromycin distribution in goats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2012;35(2):121-31.
46. Dosne A-G, Bergstrand M, Harling K, Karlsson MO. Improving the estimation of parameter uncertainty distributions in nonlinear mixed effects models using sampling importance resampling. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2016;43(6):583-96.
47. Karlsson MO, Beal SL, Sheiner LB. Three new residual error models for population PK/PD analyses. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 1995;23(6):651-72.
48. Beal SL. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2001;28(5):481-504.
49. Chevance A, Jacques AM, Laurentie M, Sanders P, Henri J. The present and future of withdrawal period calculations for milk in the European Union: focus on heterogeneous, nonmonotonic data. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2017;40(3):218-30.

50. Lindbom L, Pihlgren P, Jonsson N. PsN-Toolkit—a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2005;79(3):241-57.
51. Keizer RJ, Van Benten M, Beijnen JH, Schellens JH, Huitema AD. Pirana and PCluster: a modeling environment and cluster infrastructure for NONMEM. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2011;101(1):72-9.
52. Landersdorfer CB, Nguyen T-H, Lieu LT, Nguyen G, Bischof RJ, Meeusen EN, et al. Substantial Targeting Advantage Achieved by Pulmonary Administration of Colistin Methanesulfonate in a Large-Animal Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(1):e01934-16.
53. Karvanen M. Optimization of colistin dosage in the treatment of multiresistant Gram-negative infections: *Acta Universitatis Upsaliensis*; 2013.
54. Huang JX, Blaskovich MA, Pelingon R, Ramu S, Kavanagh A, Elliott AG, et al. Mucin binding reduces colistin antimicrobial activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(10):5925-31.
55. Azad MA, Huang JX, Cooper MA, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. Structure–activity relationships for the binding of polymyxins with human α -1-acid glycoprotein. *Biochemical pharmacology*. 2012;84(3):278-91.
56. Holford NH, Anderson BJ. Allometric size: The scientific theory and extension to normal fat mass. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017.
57. Yousef JM, Chen G, Hill PA, Nation RL, Li J. Melatonin attenuates colistin-induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(9):4044-9.
58. Zavascki AP, Nation RL. Nephrotoxicity of polymyxins: Is there any difference between colistimethate and polymyxin B? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016.
59. Manchandani P, Zhou J, Babic JT, Ledesma KR, Truong LD, Tam VH. The role of renal drug exposure in polymyxin B-induced nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017:AAC. 02391-16.
60. Vardakas KZ, Falagas ME. Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2016.
61. Ordooei Javan A, Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *European journal of clinical pharmacology*. 2015.
62. Li M, Gehring R, Riviere JE, Lin Z. Development and application of a population physiologically based pharmacokinetic model for penicillin G in swine and cattle for food safety assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;107:74-87.
63. EMA. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. *European Medicines Agency (EMA)*, 2016 EMA/CVMP/CHMP/231573/2016.

6.1.3. Discussion/ Perspectives

Ce modèle PBPK développé chez le porc a permis d'explorer la distribution tissulaire et notamment rénale du CMS et de la colistine. Parmi les résultats significatifs de cette étude, on observe que la sécrétion tubulaire de CMS aurait une place prépondérante dans l'élimination du CMS. En outre, l'accumulation de colistine dans le rein a été confirmée dans cette espèce, à l'instar de ce qui a déjà été retrouvé chez les rongeurs de laboratoire (Arslan et al., 2016; Suzuki et al., 2013) et in vitro (Azad et al., 2015b). Notre modèle assume également que la fraction de colistine éliminée par cet organe est importante, ce qui en fait le 1^{er} organe éliminateur (quasi-entièrement par dégradation intracellulaire plutôt que par filtration). Ces résultats sont d'intérêt en raison de leur implication dans les phénomènes de néphrotoxicité induite par la colistine. D'autres études sont cependant nécessaires afin d'explorer les bases mécanistiques de notre modèle, notamment les potentiels transporteurs rénaux impliqués dans la sécrétion tubulaire de CMS.

Dans notre étude, un nombre relativement limité de porcs a été utilisé pour développer ce modèle populationnel (n=45). Cependant, aucune autre donnée de cinétique après usage de CMS (ou de colistine) par voie systémique chez le porc n'est disponible dans la littérature récente. Deux études ont reporté des cinétiques plasmatiques et tissulaires de colistine, après injection de colistine (Renard et al., 1991; Tang et al., 2009) mais les dosages ont été réalisés à partir d'une méthode microbiologique qui n'est pas considérée comme assez sensible, ni précise.

Ce modèle PBPK, couplé à une approche populationnelle en NLEM, a permis d'estimer les temps d'attente liés à l'usage de CMS chez le porc. Aucun modèle n'a été publié à ce jour en utilisant cette méthode pour estimer des temps d'attente. L'intérêt des modèles de population NLEM est de pouvoir estimer de façon robuste la variabilité inter-individuelle et de la discriminer de la variabilité résiduelle. Cette notion est importante dans l'estimation des temps d'attente qui s'applique pour une « population globale d'animaux traités » et qui doit inclure 99 % des animaux. Un autre avantage de l'approche NLEM repose sur son efficacité à intégrer des données collectées lors de schémas de prélèvements limités (sparse sampling), permettant ainsi de réduire le nombre nécessaire d'animaux pour développer le modèle. Enfin, les modèles NLEM permettent de mieux prendre en compte les données sous la LOQ que les méthodes de régressions linéaires classiques utilisées dans l'estimation des temps d'attente. En effet, cette dernière approche se base sur l'éviction de ces données ou leur fixation à la moitié de la LOQ

mais ceci peut biaiser les résultats (EMA, 2016a). D'autres type d'approches associées au modèle PBPK peuvent être utilisées pour estimer les temps d'attente, tels que des simulations de Monté Carlo (Li et al., 2017; Lin et al., 2016)}.

L'usage d'une approche NLME avec un modèle PK compartimental classique aurait pu être une alternative possible qui a déjà prouvé ses avantages en médecine vétérinaire (Lin et al., 2016). Cependant, à la différence du modèle PBPK, elle ne permet pas d'extrapoler aisément à d'autres espèces, ce qui était l'un de nos objectifs et sera décrit dans le chapitre suivant (cf. 6.2).

6.2. Modélisation PBPK– extrapolation à l’Homme et l’enfant (résultats préliminaires)

6.2.1. Introduction

Des études PK sur un nombre important de patients ont été réalisées chez l’Homme depuis quelques années (Couet et al., 2011; Falagas et al., 2010; Garonzik et al., 2011; Grégoire et al., 2014) mais ces études ne concernent que l’adulte (sain ou gravement malade). Dans les populations pédiatriques, les études se sont plutôt portées sur l’efficacité et l’innocuité des traitements avec du CMS (Çağan et al., 2017; Falagas et al., 2009a) mais les données de cinétiques sont quasi-inexistantes.

Peu de données sont disponibles chez l’enfant et ces résultats montrent une disparité importante entre les études. Ainsi, Nakwan et. al ont réalisé une PK plasmatique de colistine sur 24h (avec plusieurs prélèvements par individus) chez un faible nombre de nourrissons gravement malades (n=7) (Nakwan et al., 2016). Les auteurs ont montré qu’après la première dose de CMS à 150 000 UI/kg/jr (soit 5 mg CBA/kg/jr), les concentrations plasmatiques de colistine obtenues étaient sub-thérapeutiques (<2 mg/L) 6 h après l’injection. Récemment, une autre étude a publié des résultats de dosages de colistine chez des enfants de 1,5 mois à 14 ans (n=7) qui ont été traités avec des doses de 150 000 UI/kg/jr de CMS divisées en 2 administrations quotidiennes (Mesini et al., 2017). Les concentrations de colistine ont été mesurées à la fin d’une perfusion de CMS et juste avant une autre perfusion (concentration résiduelle) : les valeurs fluctuaient entre 4,3 et 15,9 µg/mL pour les premières et entre 0,4 et 3,0 µg/mL pour les deuxièmes. Ces fortes concentrations n’ont pas été discutées par les auteurs, mais semblent à risque pour le développement d’une néphrotoxicité par rapport à l’intervalle ciblé de 2 à 4 µg/mL de colistine à l’équilibre (chez l’adulte) (Nation et al., 2016). Ces résultats soulignent ainsi la nécessité d’optimiser les doses de CMS pour soigner efficacement et avec un risque limité les populations pédiatriques.

Dans la littérature, les doses de CMS utilisées (et publiées) chez l’enfant varient selon les hôpitaux de 50 000 à 225 000 UI/kg/jr (1,7-7,5 mg CBA/kg/jr) et sont administrées en une ou plusieurs fois quotidiennement (Çağan et al., 2017; Jajoo et al., 2011; Karbuz et al., 2014; Mesini et al., 2017; Nakwan et al., 2016; Paksu et al., 2012; Tamma et al., 2013). Actuellement, les recommandations pour les doses pédiatriques de CMS sont de 75 000 à 150 000 UI/kg/jour (soit 2,25 - 4,5 mg CBA/kg/jr) en 3 injections par l’EMA (Silvestri et al., 2012) et de 83 000 à

166 000 UI/kg/jour (2,5 - 5 mg CBA/kg/jr) par la FDA (Food and Drug Administration) à administrer en 2 à 4 injections (EMA, 2014; Nation et al., 2015). Cependant, il n'y a aucun réel consensus sur les doses optimales à utiliser. En outre, aucune recommandation posologique n'a été établie chez des enfants présentant une insuffisance rénale (Antachopoulos and Iosifidis, 2017).

L'extrapolation des posologies de l'adulte vers les populations pédiatriques n'est pas toujours aisée. Comme expliqué dans la partie bibliographique de cette thèse, le recours à des méthodes allométriques est couramment effectué pour extrapoler les paramètres PK mais n'est pas optimal pour prédire les profils plasmatiques. La modélisation PBPK apparaît comme une alternative appropriée pour ce genre d'extrapolation, même à partir d'un modèle développé chez l'animal (Parrott et al., 2011).

Notre modèle PBPK pour le CMS et la colistine précédemment développé (cf. 6.1) l'a été grâce à des porcs d'environ 50 kg (environ 14 semaines d'âge). La correspondance d'âge entre le porc et l'Homme n'est pas aisée mais selon une récente revue de la littérature, ces porcs correspondraient plutôt à des adolescents (Gasthuys et al., 2016). Cependant, si l'on considère que la correspondance peut s'établir sur la base de la maturation des différents systèmes fonctionnels de l'organisme ces porcs peuvent être considérés comme « adultes ». Notamment pour le rein, qui est un organe d'importance dans la PK du CMS et de la colistine, les porcs atteignent globalement leur maturité rénale à partir de 8 semaines d'âge (Friis, 1980; Gasthuys et al., 2016). Dans la suite du document, les porcs utilisés lors du développement du modèle seront donc considérés comme porcs adultes et dénommés comme tels.

Grâce au modèle PBPK précédemment développé chez le porc adulte, une extrapolation inter-âge et inter-espèces a été réalisée afin de pouvoir prédire les concentrations plasmatiques de colistine dans les populations pédiatriques. Seuls les résultats préliminaires de cette approche seront présentés.

6.2.2. Matériels et méthodes

6.2.2.1. Stratégie d'extrapolation

Les étapes pour aboutir à un modèle PBPK chez l'enfant ont été les suivantes :

1. Adaptation du modèle PBPK porc adulte pour obtenir un modèle **PBPK « porcin juvénile »** (extrapolation inter-âge). Ce modèle a ensuite été validé en le confrontant à des

données expérimentales plasmatiques et tissulaires de CMS et colistine obtenues chez des porcelets de différents âges. Si nécessaire, une réestimation des paramètres (précédemment estimés chez le porc adulte) était prévue à partir de ces données, suivi d'une validation interne.

2. Adaptation du modèle PBPK porc adulte pour obtenir un **modèle PBPK « Homme adulte »** (extrapolation inter-espèce). Ce modèle a ensuite été validé en le confrontant à des données expérimentales plasmatiques de CMS et colistine chez les volontaires sains déjà publiées (Couet et al., 2011). Si nécessaire, une réestimation des paramètres (précédemment estimés chez le porc adulte) était prévue à partir de ces données, suivi d'une validation interne.
3. Adaptation du modèle PBPK Homme adulte pour obtenir un **modèle PBPK « chez l'enfant »**, en utilisant les mêmes hypothèses d'extrapolations qui ont permis l'obtention du modèle PBPK « porcin juvénile » à partir du modèle PBPK porc adulte.

Ces objectifs sont illustrés dans la Figure 23.

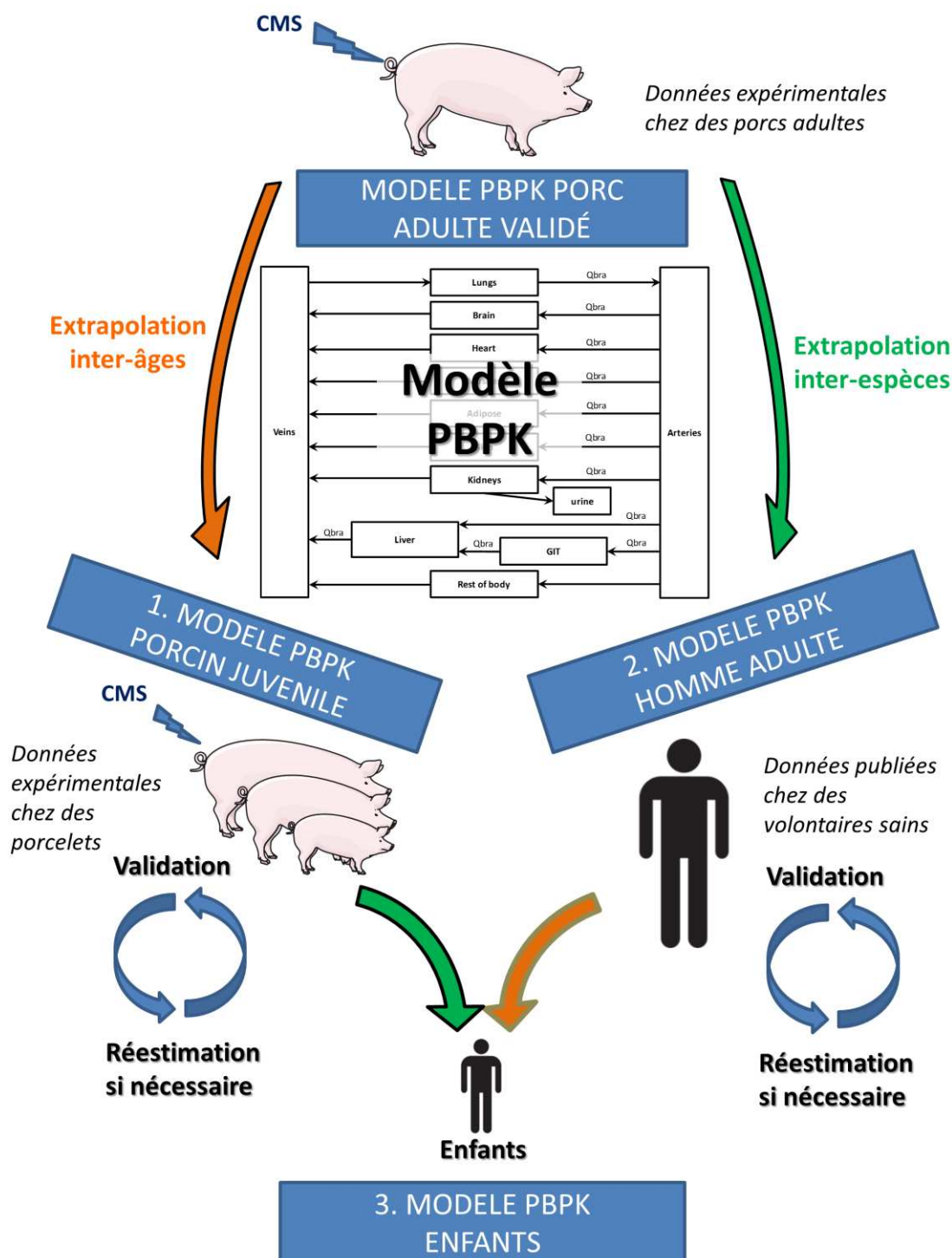


Figure 23 : Etapes et objectifs d'extrapolation du modèle PBPK.

6.2.2.2. Données expérimentales animales et humaines

La même spécialité de CMS (Colymicine 1 MIU, Sanofi Aventis, Paris, France) a été utilisée, que ce soit pour les données expérimentales chez les porcelets (cf. ci-dessous) ou pour les données des volontaires sains (Couet et al., 2011)

❖ Données expérimentales chez les porcelets

Des porcelets issus du même croisement que les porcs « adultes » (Large White x Pietrain x Duroc) et de différents âges/poids ont été utilisés lors de ces procédures expérimentales, répartis en trois groupes :

- 6 porcelets de 4 semaines environ, d'un poids moyen de $7,2 \pm 0,4$ kg (Groupe 4 sem)
- 4 porcelets de 9 semaines environ, d'un poids moyen de $17,1 \pm 1,4$ kg (Groupe 9 sem)
- 6 porcelets de 11 semaines environ, d'un poids moyen de $30,1 \pm 1,6$ kg (Groupe 11 sem)

Afin d'injecter le CMS et de récupérer les prélèvements sanguins, deux cathéters veineux centraux ont été implantés chez les porcelets sous anesthésie générale (procédure chirurgicale détaillée dans l'article, cf. 6.1.2). Après 2 jours de repos, les animaux ont été mis en cage à métabolisme afin de pouvoir récolter des échantillons d'urines et de sang.

Chaque porcelet de chaque groupe a reçu les schémas posologiques de CMS suivants (résumés dans le Tableau 3) :

A. Cinétique plasmatique après IV : Une perfusion IV sur 1h de 125 000 UI/kg de CMS. Des prélèvements de sang ont été réalisés sur 24h (12 prélèvements par individus). Les urines ont été collectées sur deux intervalles (0-8h et 8h-24h). En conséquence, sur un intervalle donné, les données urinaires étaient basées sur une ou plusieurs mictions.

B. Détermination des Kp : Environ 24h après la première perfusion, les porcelets ont reçu une posologie de CMS particulière, dans le but d'atteindre l'état d'équilibre permettant la détermination des Kp pour chaque organe. Cette posologie correspond à la procédure expérimentale n°3 de l'article, à savoir 75 000 UI/kg (bolus de charge) sur 1 h puis 1,5 h d'attente pour laisser le CMS s'hydrolyser in vivo, et une dernière perfusion à 50 000 UI/kg de CMS sur 4h. A la fin de la dernière perfusion, les animaux ont été sacrifiés et le plasma ainsi que leurs organes ont été récupérés (poumons, cerveau, foie, cœur, estomac, reins, échantillons de muscles, peau et graisse).

La détermination des Kp de CMS et de colistine s'est faite par le calcul du ratio de la concentration plasmatique à l'équilibre sur la concentration tissulaire.

Toutes ces expérimentations ont été acceptées par le comité d’éthique local et sont référencées sous le n° de dossier 2905-2015112717486085.

❖ Données expérimentales chez l’Homme adulte

Pour extrapoler le modèle du porc adulte à l’Homme, les données issues d’une précédente étude chez des volontaires sains ont été utilisées (Couet et al., 2011). Brièvement, douze hommes sains âgés en moyenne de $29,5 \pm 5,5$ ans et pesant en moyenne $72,7 \pm 9,1$ kg ont reçu 1 Million UI de CMS (34 mg CBA) en IV sur 1h. De multiples prises de sang ($n=13$) ont été réalisées dans les 18h suivant l’administration et les urines ont été collectées sur 5 intervalles sur 24h (Tableau 3). Au contraire des expérimentations chez les porcs, les urines ont été obtenues après miction « forcée » à des temps précis.

Tableau 3 : Etudes expérimentales utilisées pour développer le modèle PBPK porcin juvénile et le modèle PBPK homme adulte.

Sujets	Voie	Dose de CMS	Nombre de sujets et caractéristiques	Matrices et nombre d’échantillons par sujet
Porcelets	IV	125 000 UI/kg sur une heure	- 6 âgés de 4 sem ($7,2 \pm 0,4$ kg)	Plasma : 12 Urine : 2
	IV	75 000 UI/kg pendant 1h; 1,5h sans administration; 50 000 UI/kg pendant 4h	- 4 âgés de 9 sem ($17,1 \pm 1,4$ kg) - 6 âgés de 11 sem ($30,1 \pm 1,6$ kg)	Plasma : 1 Organes : 1
Hommes	IV	1 Million UI sur une heure	12 âgés de $29,5 \pm 5,5$ ans ($72,7 \pm 9,1$ kg)	Plasma : 13 Urine : 5 max

La valeur de la fraction libre de CMS (f_{u_CMS}) étant inconnue chez l’Homme, celle-ci a été déterminée dans notre étude à partir de plasma humain, en suivant la même méthode d’ultrafiltration que dans l’article du modèle PBPK chez le porc adulte. Brièvement, du CMS a été ajouté à du plasma de volontaire sain adulte à des concentrations théoriques de $5 \mu\text{g/mL}$ et $0,5 \mu\text{g/mL}$, puis les solutions ont été ultra-filtrées à travers une membrane en cellulose (Centrifree, Merck, Alsace, France) par centrifugation (3000 g) à 37°C pendant 30 min. La même démarche

a été réalisée avec du tampon phosphate au lieu du plasma pour tenir compte de la perte par hydrolyse (Li et al., 2003b) et de la potentielle liaison non-spécifique au matériel de laboratoire.

6.2.2.3. Matrices biologiques et méthode analytique

Les prélèvements, le stockage et le dosage (par l'HPLC/MS-MS) des échantillons de porcelets (sang, tissus, urines) ont été réalisés de la même façon que précédemment décrite (cf 6.1.2). Les LOQ étaient à 0,02 µg/mL pour la colistine plasmatique ; 0,2 µg/g pour la colistine tissulaire sauf pour le cœur avec une LOQ à 0,5 µg/g. Pour le CMS, en raison de sa détermination de façon indirecte (cf supra), une LOQ à 0,15 µg/mL pour le plasma et à 1 µg/g pour les tissus ont été fixées.

De la même manière que pour le modèle PBPK porc adulte, les données expérimentales urinaires ont été poolées en quantités de CMS et les données expérimentales rénales ont été poolées en concentration de colistine.

6.2.2.4. Adaptation des modèles

La structure du modèle a été gardée identique pour l'extrapolation inter-âge et inter-espèce. Les particularités de chaque modèle PBPK adapté à partir du modèle PBPK porc adulte sont présentées dans les sections suivantes :

❖ Modèle PBPK porcin « juvénile »

➤ **Pour les paramètres physiologiques fixés** : la valeur du débit cardiaque a été adaptée en fonction du poids, et les débits sanguins ont été exprimés comme une fraction de ce débit cardiaque, avec les mêmes valeurs que pour le porc adulte. Seuls les paramètres liés au rein ont pu être adaptés en fonction de l'âge (le DFG et le débit sanguin rénal) (Gruskin et al., 1970) (Eskild-Jensen et al., 2001; Friis, 1983; Lødrup et al., 2008) (Tableau 4). De façon similaire, les volumes des organes sont exprimés en fractions du poids corporel total qui ont été gardées aux mêmes valeurs que celles des porcs adultes. Un manque de données physiologiques dans la littérature pour les populations juvéniles porcines explique ce choix.

➤ **Pour les paramètres déterminés expérimentalement :** les K_p de colistine ont été déterminés de façon expérimentale chez les différents porcelets (cf supra) pour évaluer l’impact de l’âge. Les fu de CMS et colistine (cette dernière étant issue de la littérature (Gasthuys et al., 2016; Rottbøll and Friis, 2016)) ont été supposées identiques à celles du porc adulte.

➤ **Pour les paramètres précédemment estimés par le modèle (PEM) :**

Il s’agit des paramètres structuraux et des effets aléatoires (IIV et RV) qui ont été estimés lors du développement du modèle PBPK chez le porc adulte. Ces paramètres seront regroupés sous la mention « PEM » dans la suite de cette étude.

Une première approche a été réalisée en testant une relation allométrique linéaire entre les paramètres et le poids (BW). Ainsi, les paramètres de clairances de sécrétion tubulaire du CMS (CL_{sec_CMS}) et de réabsorption de la colistine (CL_{reabs_COLI}) ont été adaptés comme suit :

$$CL_{porcelet} = CL_{porc_adulte} \cdot \left(\frac{BW_{porcelet}}{BW_{porc_adulte}} \right) \quad (\text{Eq. 9})$$

Pour les constantes de transfert (binding vasculaire, K_{BIND_COLI} et $K_{BIND_OUT_COLI}$ et binding intracellulaire du rein, K_{ON_COLI} et K_{OFF_COLI}), les valeurs ont été gardées à l’identique à celles de l’adulte tel que :

$$K_{X_{porcelet}} = \frac{CL_{X_{porc_adulte}} \cdot \left(\frac{BW_{porcelet}}{BW_{porc_adulte}} \right)}{V_{X_{porc_adulte}} \cdot \left(\frac{BW_{porcelet}}{BW_{porc_adulte}} \right)} = \frac{CL_{X_{porc_adulte}}}{V_{X_{porc_adulte}}} = K_{X_{porc_adulte}} \quad (\text{Eq. 10})$$

avec K_X : la constante de transfert x ; CL_X : la clairance associée ; V_X : le volume associé

Concernant les variabilités inter-individuelles (IIV) et les erreurs résiduelles (RV), les valeurs estimées chez le porc adulte ont été gardées pour les porcelets. Les valeurs de l’ensemble des paramètres PEM adaptées pour le modèle porcin juvénile sont détaillées dans le Tableau 5.

Tableau 4 : Valeurs des paramètres physiologiques implémentés dans le modèle porcin juvénile

Paramètres	Groupes de porcelets			Fraction du volume Fraction du débit
	4 sem	9 sem	11 sem	
Volume total	7,2	17	30	1
Débit cardiaque	61	145	256	1
Artère				
Volume (L)	0,19	0,46	0,81	0,027
Débit (L/h)	61	145	256	1
Veine				
Volume (L)	0,38	0,91	1,6	0,053
Débit (L/h)	61	145	256	1
Poumon				
Volume (L)	0,19	0,46	0,81	0,027
Débit (L/h)	61	145	256	1
Cerveau				
Volume (L)	0,020	0,060	0,10	0,0034
Débit (L/h)	1,2	2,9	5,1	0,020
Cœur				
Volume (L)	0,040	0,11	0,19	0,0062
Débit (L/h)	2,3	5,4	9,5	0,037
Muscles				
Volume (L)	0,55	6,5	11	0,38
Débit (L/h)	12	29	51	0,20
Peau				
Volume (L)	0,55	1,3	2,3	0,077
Débit (L/h)	3,1	7,3	13	0,050

Paramètres	Groupes de porcelets			Fraction du volume Fraction du débit
	4 sem	9 sem	11 sem	
Graisse				
Volume (L)	1,3	3,1	5,4	0,18
Débit (L/h)	10	25	43	0,17
Tube digestif				
Volume (L)	0,45	1,1	1,9	0,062
Débit (L/h)	13	32	56	0,22
Foie				
Volume (L)	0,19	0,46	0,81	0,027
Débit ^a (L/h)	17	39	69	0,27
Rein				
Volume (L)	0,020	0,050	0,090	0,0030
Sous-compartiments ^b				
Vasculaire	0,0014	0,0034	0,0061	0,067
Extravasculaire	0,0026	0,0062	0,011	0,12
Lumen des tubules	0,0043	0,010	0,018	0,2
Intracellulaire ^c	0,013	0,031	0,055	0,61
Débit ^d (L/h)	5,5	17	33	0,09 0,12 0,13
Vessie ^d	0,07	0,17	0,30	0,01
Reste du corps^e				
Volume (L)	1,0	2,4	4,2	0,14
Débit (L/h)	7,3	17	31	0,16 0,13 0,12
DFG^f (L/h)	0,94	3,2	4,2	NC

^a artère hépatique + veine porte ; ^b en fraction du volume rénal (pas de débit) ; ^c calculé : 1 – somme des 3 autres sous-compartiments ; ^d débit adapté à chaque groupe d’après (Gruskin et al., 1970) ^e pas de débit ; ^e fractions des débit et volumes calculés : 1 – somme des autres compartiments ; ^f d’après (Eskild-Jensen et al., 2001; Friis, 1983; Lødrup et al., 2008) ; NC : non concerné

Tableau 5 : Valeurs des paramètres PEM adaptés au modèle PBPK porcin juvénile

Groupes Paramètres	4 sem (~7,2 kg)	9 sem (~17,1 kg)	11 sem (~30,1 kg)
Paramètres relatifs au CMS			
K_{hyd_CMS} (h^{-1})	0.262		
Kp_{mix_CMS} (sans unité)	0.217		
CL_{sec_CMS} (L/h)	1,20	2,82	5,01
Paramètres relatifs à la colistine			
K_{deg_COLI} (h^{-1})	0,389		
K_{BIND_COLI} (h^{-1})	0,187		
$K_{BIND_OUT_COLI}$ (h^{-1})	0,104		
K_{ON_COLI} (h^{-1})	0,091		
K_{OFF_COLI} (h^{-1})	0,0145		
CL_{reabs_COLI} (L/h)	15,2	36,0	63,6
Erreurs résiduelles (proportionnelles)			
RV_{plas_CMS} (CV %)	41		
RV_{plas_COLI} (CV %)	41		
RV commune CMS et colistine dans le plasma (CV %)	28		
RV_{tissu_CMS} (CV %)	33		
RV_{KID} (CV %)	57		
RV_{URINE} (CV %)	51		

❖ Modèle PBPK Homme adulte

- **Pour les paramètres physiologiques fixés :** tous les paramètres physiologiques ont été adaptés, en utilisant les valeurs de la littérature de référence (Brown et al., 1997; Edginton et al., 2006; ICRP, 2002) (Tableau 6).
- **Pour les paramètres déterminés expérimentalement :** les Kp de colistine du porc adulte ont été conservés pour l’Homme adulte et la valeur du Kp de CMS commun à tous les

organes a été conservée. La fraction libre plasmatique de CMS a été déterminée expérimentalement et celle de colistine issue de la littérature (34 % (Mohamed et al., 2012)

- **Pour les paramètres PEM :** de la même manière que pour l’adaptation du modèle aux porcelets, une relation allométrique linéaire entre les paramètres et le poids a été testée (Tableau 8). Concernant les variabilités inter-individuelles (IIV) et les erreurs résiduelles (RV), les valeurs estimées chez le porc adulte ont été gardées à l’identique.

Tableau 6 : Valeurs des paramètres pour le modèle PBPK Homme adulte.

Paramètres	Homme adulte (~73 kg)		Enfant 5 ans (~19 kg)	
Compartiments	Volume en L (fraction du poids)	Débit sanguin en L/h (fraction du débit cardiaque)	Volume en L (fraction du poids)	Débit sanguin en L/h (fraction du débit cardiaque)
Artère	1,9 (0,026)	366 (1)	0,49 (0,026)	204 (1)
Veine	3,7 (0,050)	366 (1)	0,95 (0,05)	204 (1)
Poumon	1,3 (0,018)	366 (1)	0,13 (0,0066)	204 (1)
Cerveau	0,15 (0,0021)	48 (0,13)	1,3 (0,0070)	54 (0,26)
Cœur	0,42 (0,0057)	16 (0,043)	0,085 (0,0045)	8,2 (0,040)
Muscles	32 (0,44)	66 (0,18)	5,6 (0,29)	13 (0,062)
Peau	3,8 (0,052)	19 (0,053)	0,57 (0,0030)	10 (0,050)
Graisse	15 (0,20)	19 (0,053)	5,5 (0,28)	10 (0,050)
Tube digestif	1,3 (0,018)	70 (0,19)	0,32 (0,017)	37 (0,18)
Foie^a	2,3 (0,032)	95 (0,26)	0,57 (0,030)	50 (0,025)

Suite du tableau

Paramètres	Homme adulte (~73 kg)		Enfant 5 ans (~19 kg)	
Compartiments	Volume en L (fraction du poids)	Débit sanguin en L/h (fraction du débit cardiaque)	Volume en L (fraction du poids)	Débit sanguin en L/h (fraction du débit cardiaque)
Rein	0,44 (0,0060)	81 (0,22)	0,11 (0,0058)	35 (0,17)
Sous-compartiments ^b				
Vasculaire	0,10 (0,23)	NC	0,025 (0,23)	NC
Extravasculaire	0,088 (0,20)		0,022 (0,20)	
Lumen des tubules	0,088 (0,20)		0,022 (0,20)	
Intracellulaire ^c	0,162 (0,37)		0,041 (0,37)	
Vessie ^d	0,73 (0,01)	NC	0,19 (0,01)	NC
Reste du corps ^e	10 (0,14)	22 (0,062)	3,4 (0,17)	24 (0,11)
Autres paramètres physiologiques				
DFG (L/h)	7,2		2,7	
Hématocrite	0,45		0,37	
Débit cardiaque (L/h)	366		204	

^a artère hépatique + veine porte ; ^b volumes en fraction du volume rénal (pas de débit) ; ^c fraction calculée : 1 – somme des 3 autres sous-compartiments ; ^d pas de débit ; ^e fractions des débit et volumes calculés : 1 – somme des autres compartiments ; NC : non concerné
D'après (Edginton and Willmann, 2006; ICRP, 2002)

❖ Modèle PBPK enfant

- **Pour les paramètres physiologiques fixés :** tous les paramètres physiologiques ont été adaptés pour un enfant typique de 5 ans, en utilisant les valeurs de la littérature de référence (Edginton et al., 2006; ICRP, 2002) (Tableau 6).
- **Pour les paramètres déterminés expérimentalement :** pour les K_p de colistine et CMS, les valeurs déterminées expérimentalement chez les porcelets ont été utilisées. La fraction libre plasmatique de CMS déterminée expérimentalement dans le plasma humain a été gardée à l'identique pour l'enfant., ainsi que celle de colistine (issue de la littérature).
- **Pour les paramètres PEM :** en suivant la même méthode que pour l'adaptation du modèle porc adulte aux porcelets, les paramètres utilisés chez l'Homme ont été adaptés grâce à la même relation allométrique entre les paramètres et le poids (Tableau 6).

6.2.2.5. Validation externe des modèles

Afin de valider l'adaptation des modèles PBPK porcin juvénile et PBPK Homme adulte, 1000 simulations ont été réalisées en utilisant les doses et poids des sujets des données expérimentales (porcelet et volontaires sains, respectivement) et l'intervalle de prédiction à 90 % a été comparé aux données observées.

Si les résultats de cette validation n'étaient pas satisfaisant, une réestimation des paramètres a alors été effectuée (cf. 6.2.2.6).

Pour le modèle PBPK chez l'enfant, en raison de l'absence de données de cinétique plasmatique chez l'enfant dans la littérature, le modèle n'a pu être validé. Seules des prédictions moyennes ont été effectuées (cf. 6.2.2.7)

6.2.2.6. Réestimation des paramètres et validation interne

Lorsqu'une réestimation des paramètres était nécessaire, celle-ci a été effectuée à partir de 75 % des données expérimentales (porcelets ou volontaires sains, selon le modèle) qui auront été aléatoirement choisies.

Pour le modèle PBPK Homme adulte, en l'absence de données tissulaires, notamment rénales, les paramètres liés au rein n'ont pas été réestimés mais l'adaptation allométrique au poids a été conservée pour l'adaptation du modèle. Concernant les données urinaires, comme la vessie a été vidée à la fin de chaque période de recueil (cf. supra), celles-ci peuvent être considérées comme équivalentes aux quantités intra-vésicales et c'est donc le compartiment vessie qui a été utilisé pour ajuster le modèle aux données urinaires.

Une validation interne a été alors réalisée avec les 25% de données expérimentales restantes. Cette validation interne s'est faite de la même manière que décrite ci-dessus, à savoir une comparaison entre les 25 % de données observées et l'intervalle de prédiction à 90% après 1000 simulations.

6.2.2.7. Prédictions chez l'enfant

Des profils typiques de cinétique plasmatique de colistine pour un enfant de 5 ans ont été simulés pour 4 doses de CMS différentes : 75 000 UI/kg/j (la plus faible recommandée), 100 000 UI/kg/j, 166 000 UI/kg/j (la plus forte recommandée) et 225 000 UI/kg/jr (dose retrouvée dans la littérature) données en 3 administrations IV sur une heure.

Ensuite, la dose optimale a été sélectionnée (celle donnant une concentration moyenne entre 2 et 4 mg/mL de colistine (Nation et al., 2016)) et l'effet d'une modification de la fonction rénale (augmentation/baisse de 50% du DFG) a été simulé.

6.2.2.8. Logiciels utilisés

Le logiciel NONMEM (Icon Development Solutions, Ellicott City, MD, USA) a été utilisé pour générer les prédictions du modèle. Lorsque une réestimation de paramètres était nécessaire, celle-ci a été effectuée grâce à l'algorithme FOCE-I et à la méthode M3 de Beal (Beal, 2001) pour les données sous la LOQ.

Pour générer les prédictions moyennes plasmatiques chez l'enfant, le logiciel Berkeley Madonna (version 8.3.23, University of California at Berkeley, CA, USA) a été utilisé.

Les graphes ont été réalisés sous R (version 3.4.1, www.R-project.org).

6.2.3. Résultats

6.2.3.1. Modèle PBPK porcin juvénile

Les Kp de colistine sont présentés sur la Figure 24 fonction du groupe d'âge concerné. Pour les concentrations tissulaires de colistine inférieures à la LOQ, celles-ci ont été fixées à la LOQ/2. Il s'agit majoritairement des tissus musculaires (cœur et muscles) qui ont été concernés. Aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes d'âge (test d'ANOVA, $\alpha=0,05$). En conséquence, les valeurs des Kp des porcs adultes (cf. article au 6.1.2) ont été conservées comme valeur de référence pour développer le modèle PBPK juvénile.

Concernant la détermination des Kp CMS, à l'instar de ce qui a été trouvé chez les porcs adultes, une majorité de concentrations tissulaires était sous la LOQ et donc les Kp n'ont pas été calculés. La valeur estimée chez le porc adulte (Kp_{mix_CMS}) a été gardée (Tableau 5).

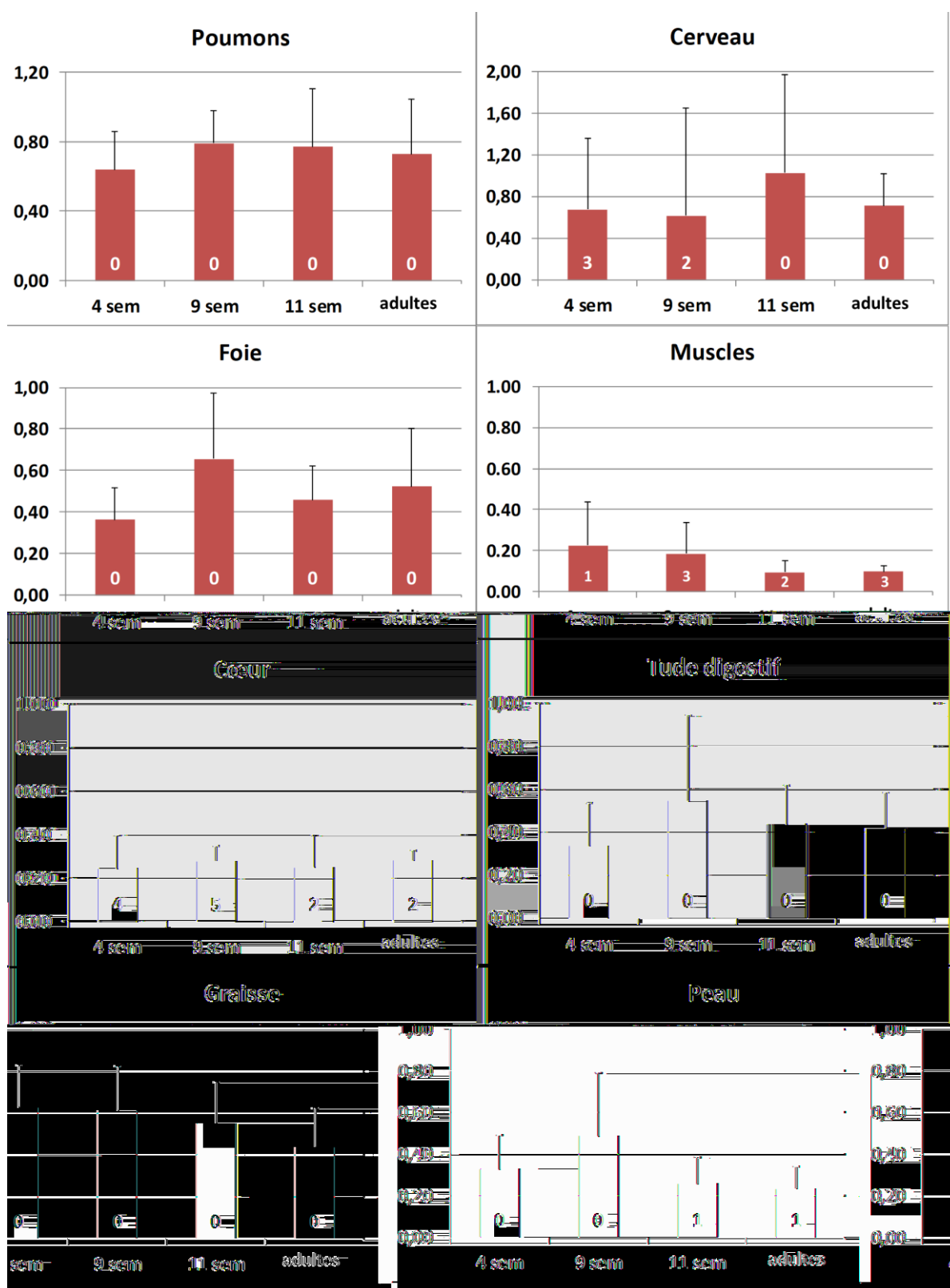


Figure 24 : Coefficients de partage (K_p) pour la colistine déterminés expérimentalement chez les porcelets de différents âges et le porc adulte (pour comparaison).

Il y a 6 animaux utilisés par catégories d'âge sauf pour le groupe 11 sem avec 4 animaux. Les chiffres en blanc renseignent le nombre de concentrations < LOQ, qui ont été fixées à une valeur égale à LOQ/2. Sem : semaines.

La validation externe du modèle pour chaque groupe de porcelets est présentée dans les Figure 25, Figure 26 et Figure 27.

Une excellente prédiction des concentrations plasmatiques de CMS et de colistine par le modèle est observée, quelque soit le groupe d'âge (Figure 25) malgré une légère sous-prédiction de la tendance centrale pour la colistine sur la phase tardive d'élimination (>10h).

Concernant les concentrations rénales, une sous-estimation de la tendance centrale est observée pour toutes les catégories d'âge des porcelets (Figure 26). Cependant toutes les données observées sont incluses dans l'intervalle de prédiction à 90 %. Cette sous-prédiction avait également été retrouvée chez le porc adulte ayant été traités avec la même posologie de CMS (cf 6.1.2)

Les prédictions des quantités urinaires excrétées surestiment globalement les données observées pour les groupes 4 et 11 semaines (surtout pour ce dernier groupe), mais sont en bonne adéquation pour le groupe 9 semaine (Figure 27).

La réutilisation des valeurs d'IIV et de RV estimées chez le porc adulte semble satisfaisant pour décrire la variabilité existante pour les porcelets.

Ainsi, cette première approche pour adapter le modèle PBPK porc adulte à la population juvénile porcine semble valide. Par conséquent, l'extrapolation vers cette tranche d'âge en adaptant les paramètres estimés de façon proportionnelle au poids apparaît comme une méthode pertinente.

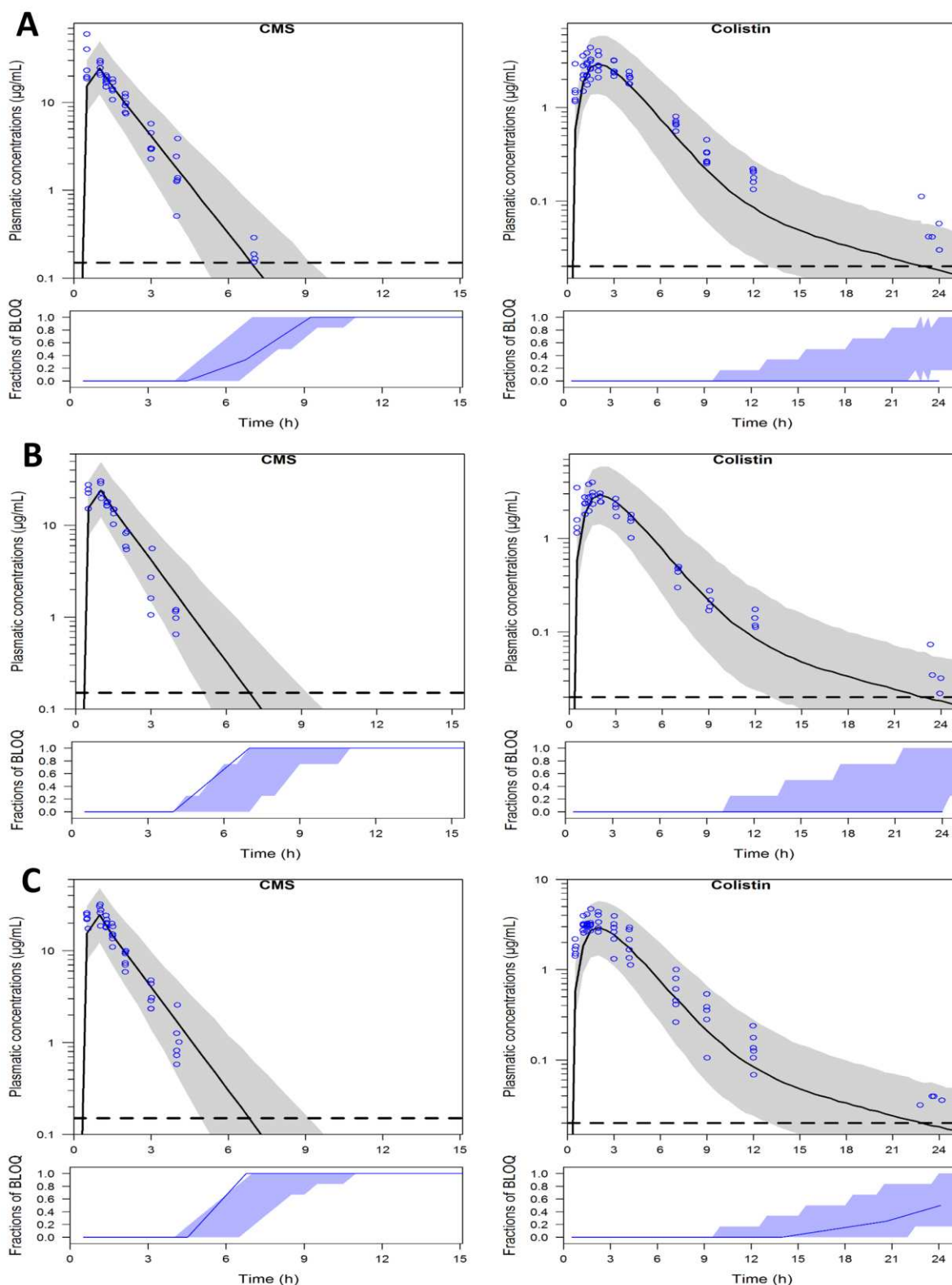


Figure 25 : Prédictions vs observations des concentrations plasmatiques de CMS et colistine dans les différents groupes d'âge après une IV de CMS à 10 mg/kg.

(A : groupe 4 semaines, B : groupe 9 semaines, C : groupe 11 semaines). Les cercles bleus représentent les données observées, l'aire en gris définit l'intervalle à 90 % de prédiction du modèle. Les lignes horizontales délimitent la LOQ. Dans les sous-graphes, l'aire en bleu représente les prédictions de la fraction de données sous à LOQ et la ligne en bleu donnent la fraction réelle de données sous la LOQ.

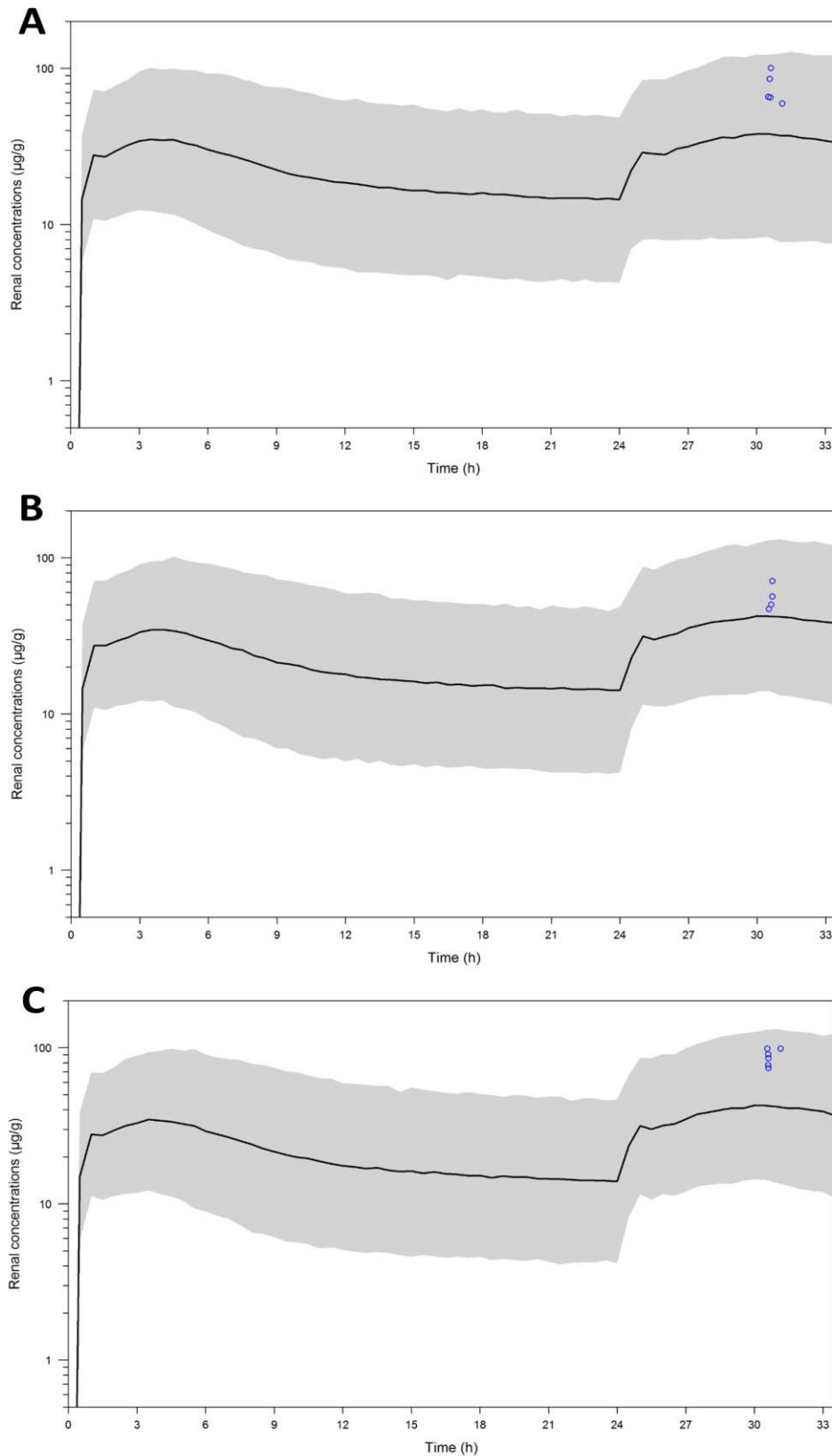


Figure 26 : Prédictions vs observations des concentrations rénales de colistine dans les différents groupes d'âge après une IV de CMS à 10 mg/kg.

(A : groupe 4 semaines, B : groupe 9 semaines, C : groupe 11 semaines). Les cercles bleus représentent les données observées, l'aire en gris définit l'intervalle à 90 % de prédiction du modèle. Aucune donnée n'était sous la LOQ.

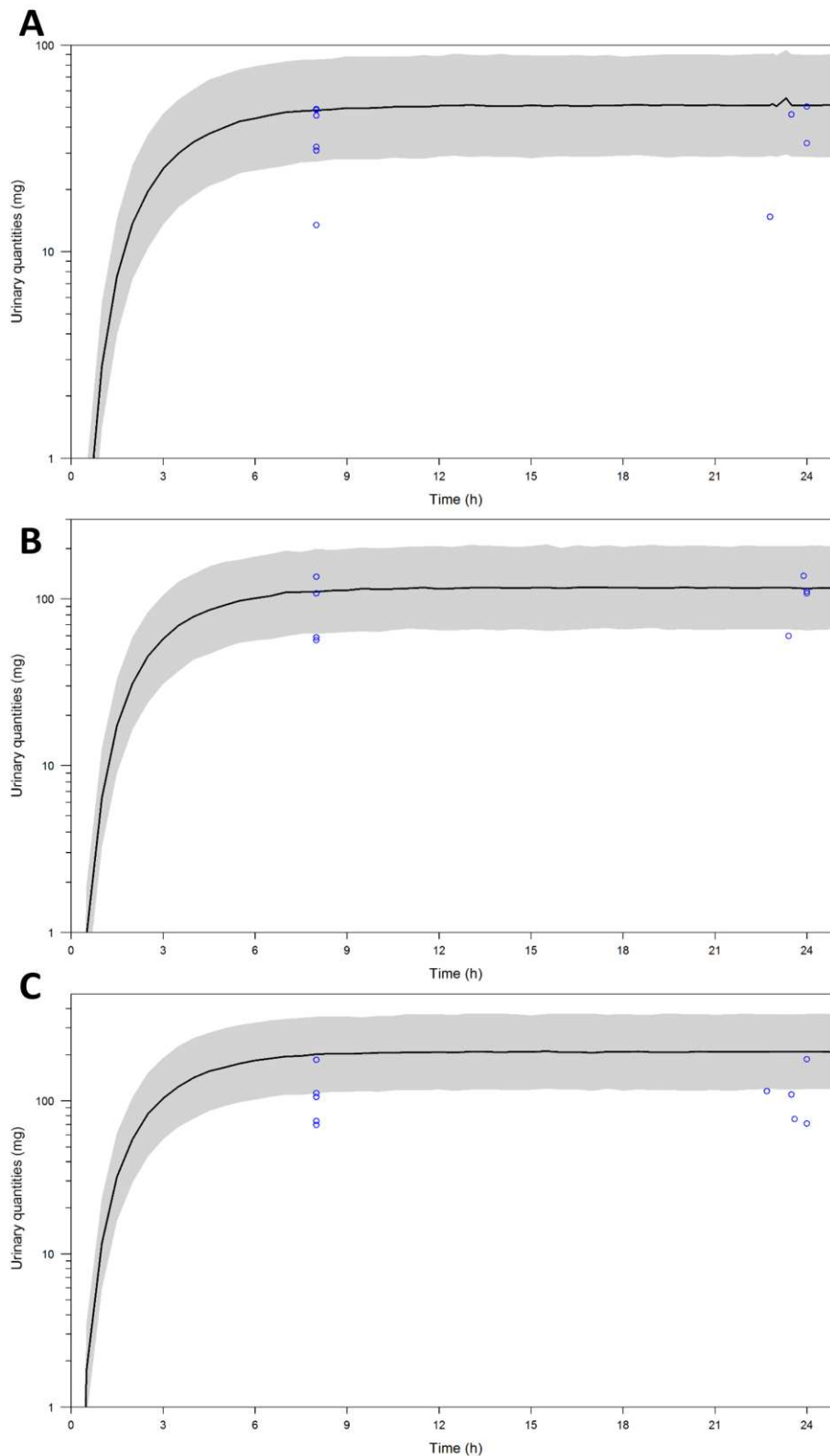


Figure 27 : Prédictions vs observations des quantités urinaires cumulées de CMS dans les différents groupes d'âge après une IV de CMS à 10 mg/kg.

(A : groupe 4 semaines, B : groupe 9 semaines, C : groupe 11 semaines). Les cercles bleus représentent les données observées, l'aire en gris définit l'intervalle à 90 % de prédiction du modèle.

6.2.3.2. Modèle PBPK Homme adulte

La détermination expérimentale de la f_{u_CMS} a donné une valeur à $38 \pm 3,5 \%$ (Tableau 7), similaire à la valeur trouvée chez le porc adulte.

Tableau 7 : Résultats de la détermination de la fraction libre de CMS dans le plasma humain

Concentration CMS théorique dans la solution mère ($\mu\text{g/mL}$)	Milieu	Concentration CMS mesurée dans la solution mère ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration CMS dans l'ultrafiltrat ($\mu\text{g/mL}$)	Perte	Fraction libre ^a
5	Tampon phosphate	6.3	$4,5 \pm 0,5$	28%	NC
5	Plasma	4.6	$1,3 \pm 0,12$	73%	$0.38 \pm 0,03$
0.5	humain	0.55	$0,15 \pm 0,01$	73%	$0.38 \pm 0,05$

NC : non concerné. ^a la fraction libre a été calculée en tenant compte de la perte par hydrolyse et potentielle liaison non-spécifique au matériel de laboratoire estimée dans le tampon phosphate.

La validation externe du modèle est présentée dans la Figure 28. Concernant les concentrations plasmatiques, le profil du CMS est acceptable, quoique légèrement sous-prédit (la phase de distribution et d'élimination sont bien décrites mais avec un décalage vertical dans l'ordre de grandeur des concentrations) A contrario, les données de colistine sont quant à elles totalement sous-prédites pendant la phase de distribution et la pente d'élimination prédite est trop forte. Concernant les données urinaires, le modèle est en bonne adéquation avec les données observées.

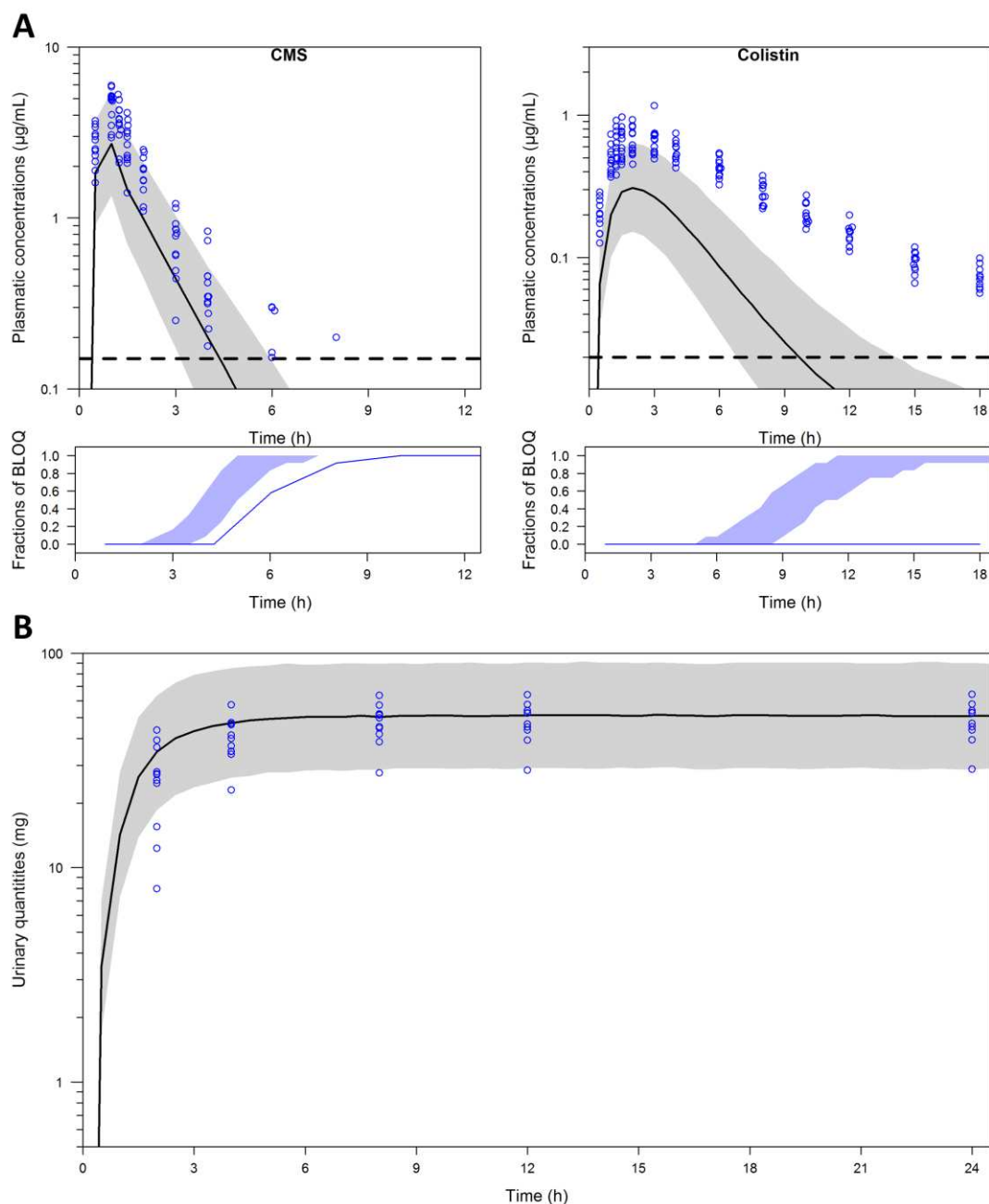


Figure 28 : Concentrations plasmatiques (A) et quantités urinaires (B) prédites à partir du modèle PBPK Homme adulte versus données observées, avec adaptation des paramètres estimés au poids.

Les cercles bleus représentent les données observées, l'aire en gris définit l'intervalle à 90 % de prédiction du modèle. Les lignes horizontales délimitent la LOQ. Dans les sous-graphes, l'aire en bleu représente les prédictions de la fraction de données sous la LOQ et la ligne en bleue donnent la fraction réelle de données sous la LOQ.

En raison de la faible capacité de prédiction du modèle à prédire les concentrations plasmatiques de colistine, le modèle n'a pas été considéré validé et il a donc été décidé de réestimer les paramètres PEM. Les résultats de l'estimation sont détaillés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Valeurs des paramètres PEM réestimés pour le modèle PBPK Homme adulte et comparaison avec l'approche allométrique.

Paramètres	Approche allométrique proportionnelle au poids		Réestimation	
	Valeur	IIV : CV %	Valeur (RSE %)	IIV : CV % (RSE %)
Paramètres relatifs au CMS				
K_{hyd_CMS} (h ⁻¹)	0,262	-	0,414 (6,5)	14,0 (57)
Kp_{mix_CMS} ^a (sans unité)	0,217	-	0,217	-
CL_{sec_CMS} (L/h)	11,7	43,5	2,07 (24)	-
Paramètres relatifs à la colistine				
K_{deg_COLI} (h ⁻¹)	0,389	26,6	0,154 (11)	-
K_{BIND_COLI} (h ⁻¹)	0,187	-	0,557 (24)	-
$K_{BIND_OUT_COLI}$ (h ⁻¹)	0,104	-	0,190 (33)	-
K_{ON_COLI} ^a (h ⁻¹)	0,091	-	0,091	-
K_{OFF_COLI} ^a (h ⁻¹)	0,0145	-	0,0145	-
CL_{reabs_COLI} ^a (L/h)	148	-	148	-
Erreurs résiduelles (proportionnelles)				
RV_{plas_CMS} (CV %)	41	-	45 (19)	-
RV_{plas_COLI} (CV %)	41	-	26 (17)	-
RV commune CMS et colistine dans le plasma (CV %)	28	-	20 (26)	-
RV_{URINE} (CV %)	51	-	58 (30)	-

^a paramètres non réestimés en l'absence de données tissulaires ; CV : coefficient de variation ; RSE : relative standard error

De façon notable, la constante d'hydrolyse du CMS (K_{hyd_CMS}) et la constante de dégradation de la colistine (K_{deg_COLI}) ont été estimées plus forte et plus faible que chez le porc, respectivement. La clairance de sécrétion tubulaire du CMS (CL_{sec_CMS}) apparaît également moins importante dans l'élimination urinaire du CMS chez l'Homme que pour le porc. Les faibles valeurs de RSE (<33%) estimées attestent que la précision des estimations des paramètres structuraux était satisfaisante.

Contrairement au modèle porcin adulte, une seule IIV a pu être estimée, concernant la constante d'hydrolyse du CMS (K_{hyd_CMS}).

Les résultats de la validation interne du modèle à partir de ces nouvelles valeurs de paramètres estimés sont présentés dans la Figure 29. Une excellente adéquation entre les données plasmatiques de CMS et colistine et les prédictions du modèle ont été observées. Pour les données urinaires, une légère sous-prédiction a été notée. Le modèle a donc été considéré comme valide.

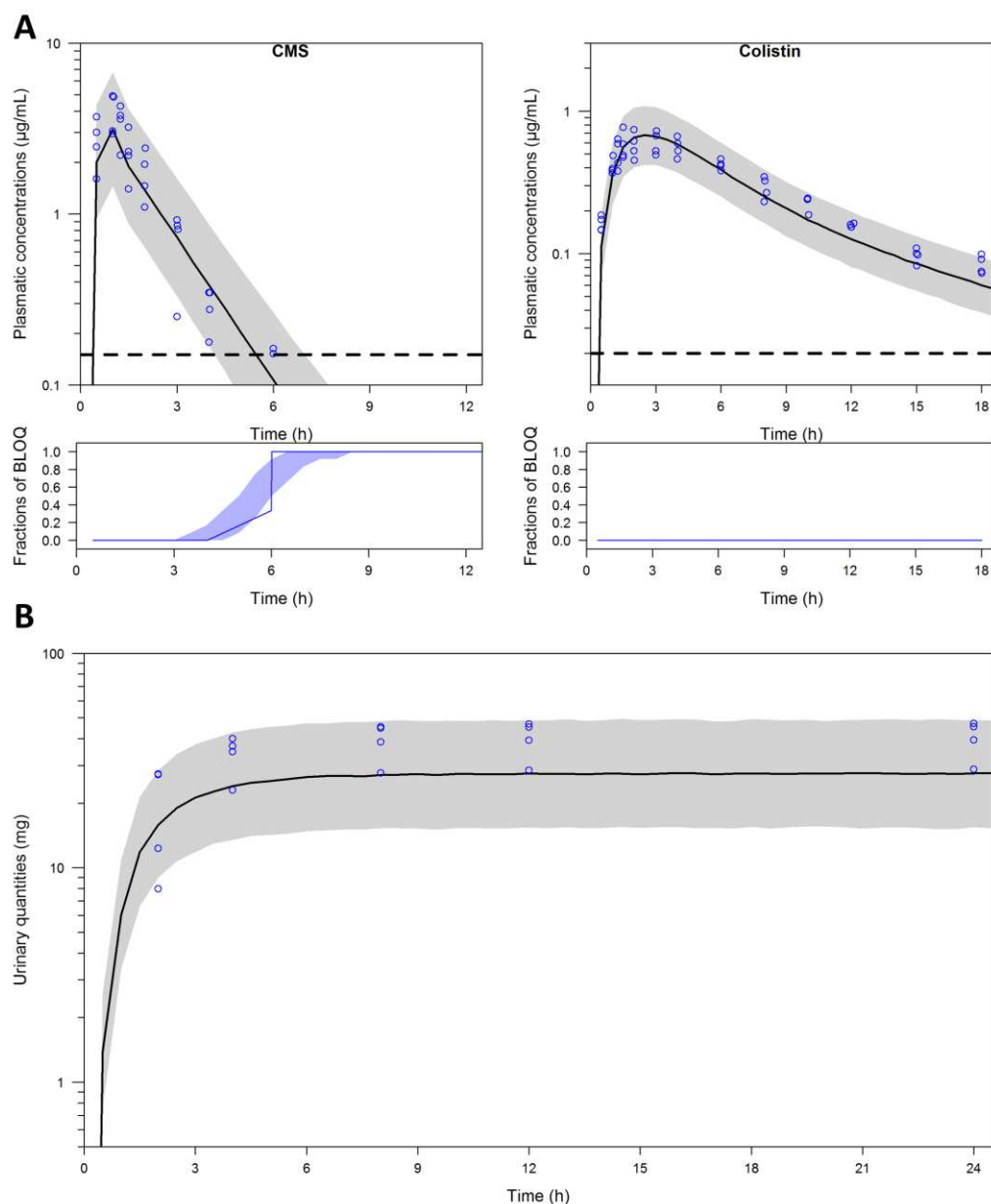


Figure 29 : Concentrations plasmatiques (A) et quantités urinaires (B) prédites à partir du modèle PBPK Homme adulte versus données observées, avec réestimation des paramètres.

Les cercles bleus représentent les données observées, l'aire en gris définit l'intervalle à 90 % de prédiction du modèle. Les lignes horizontales délimitent la LOQ. Dans les sous-graphes, l'aire en bleu représente les prédictions de la fraction de données sous la LOQ et la ligne en bleue donnent la fraction réelle de données sous la LOQ.

6.2.3.3. Modèle PBPK enfant

L'adaptation du modèle PBPK à l'enfant a été effectuée en utilisant les paramètres structuraux réestimés chez le volontaire sain et en les adaptant de façon allométrique au poids (à l'instar de la démarche chez le porcelet). A partir de ce modèle, les profils de concentration plasmatique de colistine en fonction de 4 doses différentes de CMS ont été simulés pour un enfant typique de 5 ans (Figure 30).

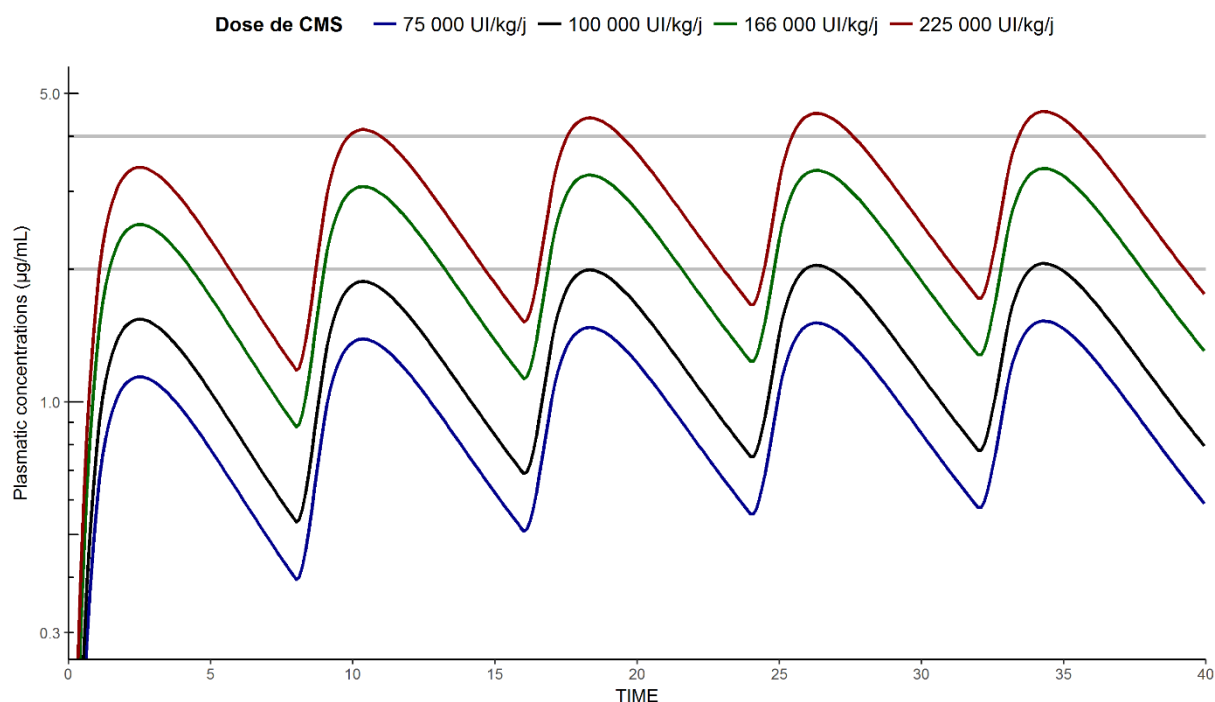


Figure 30 : Profil typique de colistine plasmatique chez un enfant de 5 ans en fonction de la dose de CMS

Les 2 lignes grises à 2 et 4 µg/mL délimitent la zone cible de concentration plasmatique de colistine. Le traitement consistait en l'administration répétée d'une dose de CMS en IV sur 1h toutes les 8h.

L'état d'équilibre plasmatique est atteint à partir du 2^e jour de traitement. La dose la plus forte (225 000 UI/kg) semble nécessaire pour obtenir des concentrations plasmatiques de colistine à l'équilibre comprises entre 2 et 4 µg/mL, avec une concentration moyenne de 3,2 µg/mL. La dose de 166 000 UI/kg/jr permet également d'obtenir une concentration moyenne acceptable à 2,4 µg/mL. Les autres schémas posologiques engendrent des concentrations moyennes en colistine trop faibles vis-à-vis de cet objectif.

L'effet d'une modification de la fonction rénale a ensuite été évalué chez un enfant typique de 5 ans et pour la dose de CMS la plus forte (Figure 31). Une baisse du DFG de 50 % donnerait une concentration moyenne à environ 4,8 $\mu\text{g/mL}$ au lieu de 3,2 $\mu\text{g/mL}$. La hausse du DFG impacte moins dans notre modèle, car les concentrations plasmatiques à l'équilibre restent majoritairement au-dessus de 2 $\mu\text{g/mL}$ (concentration moyenne à 2,3 $\mu\text{g/mL}$).

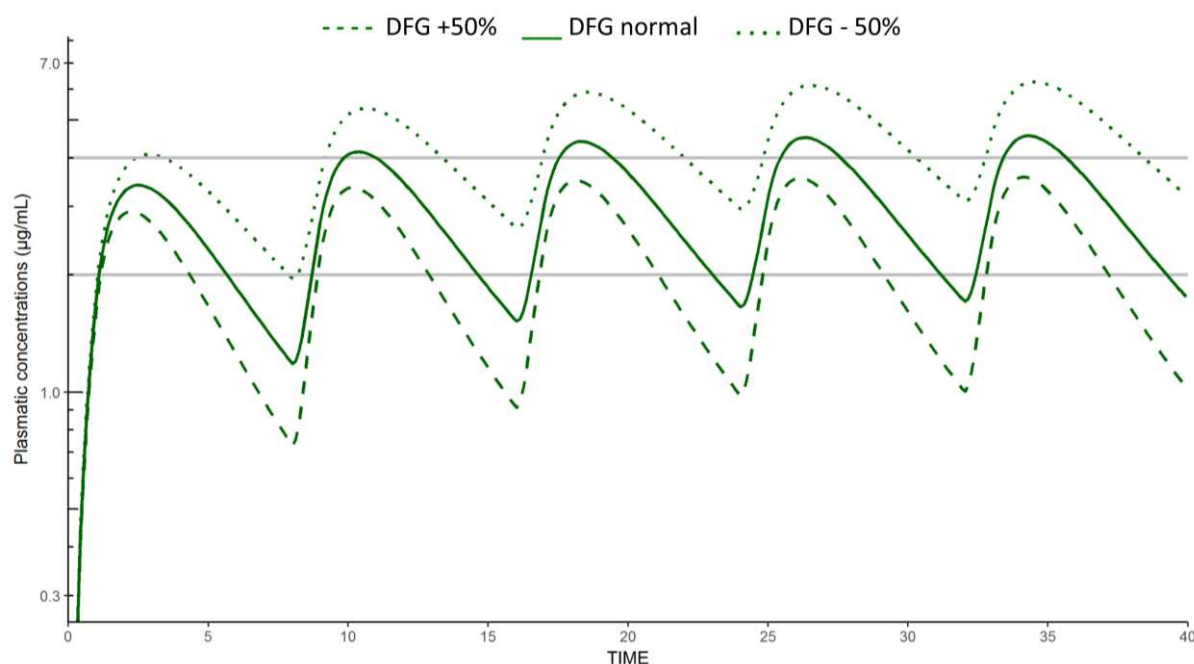


Figure 31 : Impact d'une variation du DFG sur le profil typique de colistine plasmatique chez un enfant de 5 ans traité avec du CMS.

La dose est de 225 000 UI/kg/8h de CMS. Les 2 lignes grises à 2 et 4 $\mu\text{g/mL}$ délimitent la zone cible de concentration plasmatique de colistine.

6.2.4. Discussion/ Perspectives

La démarche générale de cette étude a été de partir d'un modèle PBPK pour le CMS et la colistine initialement développé chez le porc adulte puis chez le porcelet, avant de l'adapter à l'Homme adulte puis à l'enfant, en suivant l'exemple de Parrot et al. (Parrott et al., 2011). Les différentes étapes suivies pour l'adaptation de ces modèles sont discutées dans les paragraphes suivants.

Dans un premier temps, le modèle PBPK précédemment développé chez le porc adulte a été adapté aux porcelets (de 3 groupes d'âge différents), grâce à l'utilisation d'une relation proportionnelle au poids pour les paramètres PEM structuraux. En outre, les K_p de CMS et colistine déterminés chez les porcs adultes ont été gardés pour cette adaptation car aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes d'âge (Figure 24), soulignant ainsi que l'influence de l'âge sur la distribution tissulaire de colistine semble limitée (sur la tranche d'âge testée). Les concentrations rénales mesurées chez les différents porcelets étaient similaires quel que soit l'âge (Figure 26), ce qui renforce également cette observation. Globalement, la bonne adéquation entre les prédictions du modèle et les données expérimentales plasmatiques, urinaires et rénales des porcelets (Figure 25 - Figure 27) a permis de valider cette extrapolation inter-âge pour le CMS et la colistine, et ainsi de valider le modèle PBPK porcin juvénile.

Ainsi, l'adaptation des PEM selon une relation proportionnelle au poids de l'animal semble suffisante pour décrire de façon pertinente la PK plasmatique et rénale du CMS et de la colistine lors d'extrapolation inter-âge. Ceci est en accord avec les auteurs qui soulignent que l'usage d'une relation allométrique de type puissance (avec un exposant 0,75 le plus souvent) ne donne pas forcément de meilleurs prédictions que la relation linéaire au poids (Fisher and Shafer, 2016) et cette approche simple a été privilégiée. En outre, le recours à l'allométrie a été nécessaire en l'absence d'informations mécanistiques précises concernant le métabolisme et l'élimination du CMS et de la colistine (réactions biochimiques et transporteurs impliqués), comme par exemple sur la sécrétion tubulaire de CMS qui est décrite par le modèle PBPK. Lorsque les données seront disponibles, il sera alors possible d'extrapoler sur une base plus physiologique.

Une des limites du modèle PBPK porcin juvénile repose sur le manque de données physiologiques porcines concernant l'évolution des volumes et débits sanguins de chaque organe en fonction de l'âge. Les données de la littérature concernent majoritairement des porcs de 25 à 50 kg (ou de très jeunes porcelets âgés de quelques jours) mais peu sont disponibles pour la tranche d'âge utilisée dans cette étude. Dans notre modèle PBPK porcin juvénile, les valeurs physiologiques ont donc été transposées à partir de ces données de la littérature. Ainsi, même si le porcelet apparaît comme un modèle juvénile attrayant pour extrapoler aux populations

pédiatriques (Gasthuys et al., 2016), d'autres études sont nécessaires pour enrichir les données physiologiques et permettre d'améliorer ces modèles PBPK.

Dans un 2^e temps, une extrapolation inter-espèces du modèle PBPK porc adulte vers l'Homme a été réalisée. L'adaptation des paramètres PEM structuraux basée sur une relation allométrique en fonction du poids n'a pas donné de résultats probants. Si les prédictions des profils PK du CMS plasmatique et urinaire ont décrit de façon acceptable les données observées chez les volontaires sains, il en a été tout autrement pour les concentrations de colistine plasmatiques qui ont été largement sous-prédites (Figure 28). Le choix a donc été fait de réestimer l'ensemble des paramètres PEM, hormis ceux en lien avec les concentrations tissulaires en raison de l'absence de données expérimentales. La réestimation des paramètres a permis d'obtenir un modèle décrivant correctement les concentrations plasmatiques de CMS et colistine chez l'Homme, et une validation du modèle a été effectuée sur une partie des données observées (Figure 29). Aucune modification structurale du modèle n'a été nécessaire, ce qui souligne la pertinence de ce modèle pour prédire les concentrations plasmatiques chez l'Homme. L'estimation d'une constante d'hydrolyse du CMS (K_{hyd_CMS}) plus forte mais d'une constante de dégradation de colistine (K_{deg_COLI}) plus faible chez l'Homme (Tableau 8) que chez le porc pourrait s'expliquer par l'existence de mécanismes biochimiques de distribution et d'élimination de la colistine différents entre l'Homme et le porc, malgré une physiologie proche de ces deux espèces (Swindle et al., 2012). A ce jour, ces mécanismes (probablement enzymatiques) ne sont pas connus et il est donc difficile de tenir compte de la particularité de chaque espèce.

Comme chez le porc, une sécrétion tubulaire de CMS semble nécessaire pour expliquer les quantités de CMS urinaires retrouvées chez le volontaire sain. Cette sécrétion a été estimée à une valeur plus faible chez l'Homme que chez le porc adulte (2,07 L/h versus 8,35 L/h) alors que la fraction libre plasmatique de CMS était similaire. Là encore, des particularités d'espèces au niveau des transporteurs rénaux pourraient expliquer ces différences mais ceci nécessite confirmation, en l'absence de connaissances précises sur les mécanismes impliqués.

En outre, la réestimation des paramètres a été faite uniquement avec des données plasmatiques et urinaires, et donc la distribution rénale de la colistine n'a pu être correctement renseignée. Ainsi, ce modèle préliminaire ne peut être utilisé que pour décrire la cinétique plasmatique

du CMS et de la colistine, mais ne peut présager, en l'état, du profil cinétique rénal (ni des autres organes) chez l'Homme.

Enfin la dernière étape a consisté en l'adaptation du modèle PBPK à l'enfant. Pour cette extrapolation à l'enfant, la démarche suivie a été d'utiliser la même approche que l'adaptation du modèle PBPK porc adulte au modèle PBPK porcin juvénile, qui s'était avérée satisfaisante. Ainsi les paramètres PEM structuraux réestimés chez l'Homme adulte ont été adaptés proportionnellement au poids. En l'absence de réelles données de validation disponibles chez l'enfant, seules des prédictions ont été proposées pour un enfant de 5 ans. Ce choix a été fait car les données physiologiques pour cet âge sont bien renseignées (Edginton et al., 2006; ICRP, 2002) et aussi car il correspondrait à un âge moyen par rapport à la correspondance d'âges des porcelets (Gasthuys et al., 2016). Le profil typique a été simulé après différentes doses de CMS retrouvées dans la littérature. Il ressort de ces simulations que les doses supérieures aux recommandations actuelles seraient nécessaires pour obtenir des concentrations plasmatiques thérapeutiques. Ces résultats sont en concordance avec la publication de Nakwan et. al et les quelques données de concentrations plasmatiques de colistine obtenues chez des patients pédiatriques au laboratoire Inserm U1070 (données non publiées), qui ont montré des concentrations plasmatiques trop faibles avec les dosages recommandés de CMS (Nakwan et al., 2016). Cependant, ils sont en contradiction avec la publication de Mesini et. al dans laquelle les concentrations en colistine étaient élevées (entre 4 et 18,9 $\mu\text{g/mL}$ en fin de perfusion) lors d'un traitement avec 150 000 UI/kg/jr de CMS (Mesini et al., 2017). D'autres études sont nécessaires pour compléter ces observations.

L'impact d'une altération de la fonction rénale sur les concentrations plasmatiques de colistine a été simulé, afin de souligner l'utilité d'un ajustement de la posologie selon la fonction rénale afin de rester dans des niveaux de concentrations thérapeutiques et limiter le risque toxique. Seul le DFG a été modifié dans notre étude mais lors d'altération de la fonction rénale, il est également possible que les mécanismes (inconnus) liés à la sécrétion tubulaire de CMS soient également impactés. Les conséquences de ces altérations physiologiques nécessiteraient des investigations plus poussées.

Plusieurs limites concernant ces extrapolations sont à mentionner. Pour l'extrapolation inter-espèces de la colistine une réestimation des paramètres obtenus chez le porc adulte a dû être

effectuée, et ce malgré la physiologie proche de ces deux espèces. Ceci souligne la faiblesse de l'approche PBPK lorsque l'ADME de la molécule est mal connue d'un point de vue mécanistique (Khalil and Laer, 2011). Lorsque les voies biochimiques de dégradation, métabolisme ou de transport, sont mieux identifiés, l'incorporation de ces informations dans le modèle PBPK permet une extrapolation inter-espèces plus pertinente (Thiel et al., 2015). Ainsi, il semble nécessaire de réaliser des expérimentations *in vitro* pour identifier les mécanismes d'hydrolyse du CMS et de dégradation de la colistine, ainsi que le transport rénal de CMS.

En outre, en raison de la réestimation des paramètres seulement à partir de données plasmatiques et urinaires chez l'Homme, le modèle ne peut être considéré comme valide pour prédire les concentrations rénales chez les patients (adulte et pédiatrique). Le rein étant un organe d'importance vis-à-vis de la toxicité de cette molécule, il serait primordial d'avoir un modèle permettant ces prédictions.

Enfin, le manque de données de cinétique plasmatique chez l'enfant ne permet pas d'avoir une vraie validation externe du modèle PBPK adapté dans cette étude. Il est donc nécessaire de réaliser ces études afin de pouvoir enrichir et d'évaluer la capacité prédictive du modèle. De plus, l'adaptation a été réalisée pour des porcelets pouvant correspondre à des enfants de plus de 2 ans mais il est trop délicat d'extrapoler ces résultats aux nourrissons et nouveau-nés (<1 an), pour lesquels la maturation fonctionnelle des organes est loin d'être terminée (Friis, 1983).

En conclusion, même si cette approche reste préliminaire, un modèle PBPK pour le CMS et la colistine a été développé chez l'enfant, grâce à une extrapolation inter-espèces et inter-âge. Seules des prédictions plasmatiques ont pu être réalisées mais ces simulations ont montré que les doses actuelles de CMS chez l'enfant sont probablement trop faibles pour obtenir des concentrations de colistine suffisantes. Une validation de ce modèle avec des données issues d'études cliniques est cependant nécessaire pour confirmer ces résultats.

CONCLUSION

La colistine s'inscrit parfaitement dans la liste des préoccupations du concept « One Health ». De par son statut d'antibiotique de dernier recours en médecine humaine, il est craint que le développement et la diffusion des résistances à son encontre (notamment les gènes *mcr*) conduisent l'Homme vers une nouvelle ère sans arsenal thérapeutique suffisant pour lutter contre certaines infections bactériennes. Une évaluation des différents usages de cette molécule en médecine humaine et vétérinaire semble donc nécessaire, afin de limiter ce risque.

En outre, cet antibiotique ayant été pendant longtemps abandonné en médecine humaine, relativement peu d'études récentes se sont attachées à explorer la PK de la colistine et de sa pro-droge. Une meilleure connaissance de sa pharmacocinétique est cependant nécessaire en raison des problèmes de néphrotoxicité (index thérapeutique étroit) qui obligent à optimiser au mieux les doses utilisées, notamment dans les sous-populations particulières comme les enfants.

Ces travaux de thèse ont permis d'apporter des éclaircissements importants sur ces sujets.

Concernant les risques de sélection de résistance à la colistine lors d'usages par voie orale :

- En production porcine, les doses thérapeutiques utilisées en Europe semblent suffisantes pour empêcher la sélection intra-intestinal des *E. coli* résistantes étant positives à *mcr-1*, probablement en raison des concentrations digestives obtenues qui sont largement supérieures à la CMI de ces souches. Même s'il faut rester prudent et qu'on ne peut présager du comportement d'autres souches *E. coli*, ces résultats sont en accord avec la prévalence de *mcr-1* qui reste globalement faible en production porcine en Europe (EMA, 2016d; Rhouma et al., 2016c) et ce malgré les fortes quantités de colistine utilisées dans cette filière de production depuis des décennies, et alors même que ce gène a été identifié chez des souches isolées au début des années 1980 (Shen et al., 2016).

Cependant, ces résultats ne suffisent pas à démontrer qu'il n'y a pas de sélection de *mcr-1* en dehors de ces conditions contrôlées et d'autres investigations sont nécessaires afin de mieux cerner ce risque. Les pistes de réflexion à poursuivre sont exposées dans les points suivants :

➤ L'impact de l'usage de colistine doit être évalué dans des conditions plus proches de celles retrouvées sur le terrain, à savoir son administration directement dans l'eau de boisson

ou l'alimentation et à l'échelle d'un groupe d'animaux car ces modalités peuvent entraîner une variabilité inter-individuelle importante dans le niveau d'exposition du microbiote intestinal à l'antibiotique par rapport au gavage individuel (Soraci et al., 2014). En outre, l'usage de colistine à des concentrations sub-thérapeutiques comme facteur de croissance est encore autorisé dans certains pays d'Asie alors que la prévalence de *mcr-1* est forte dans ces régions (Liu et al., 2015; Nguyen et al., 2016; Shen et al., 2016). L'impact de cet usage particulier sur la sélection de résistance (dont *mcr-1*) devrait être exploré pour savoir s'il à la forte prévalence retrouvée.

En outre, nos expérimentations ont été menées avec des animaux sains et une souche non-pathogène porteuse de *mcr-1*. Le même type d'étude avec des porcs malades a déjà été mené pour étudier l'émergence de résistance (mutation) à la colistine (Rhouma et al., 2016b). Les porcelets atteints d'infection digestive colibacillaire sont sujets à des modifications importantes de leur équilibre digestif qui pourrait avoir un impact sur les phénomènes de sélection. Ainsi, l'impact d'un traitement à la colistine sur la sélection d'une souche *E. coli* pathogène et porteuse de *mcr-1* inoculée chez le porc semble intéressante. En effet, de telles souches pathogènes porteuses de *mcr-1* ont déjà été identifiées au Japon dans des élevages porcins (Kusumoto et al., 2016).

➤ La capacité de diffusion des souches porteuses de *mcr-1* entre animaux d'un même élevage devrait également être explorée. Le même type d'expérimentation que dans notre étude pourrait ainsi être mené, à savoir inoculation d'une souche type *ECmcr1+* sur certains porcs puis mise en contact de ces animaux avec d'autres animaux non porteurs. Ce type de protocole a déjà démontré son efficacité pour quantifier la transmission d'une souche de *E. coli* résistante à une fluoroquinolone entre porcs (Andraud et al., 2011).

➤ Etudier les phénomènes de diffusion de *mcr-1* vers d'autres espèces bactériennes in vivo dans les intestins, dont les populations microbiennes non cultivables. L'usage de techniques métagénomiques de type « whole génome sequencing » est une approche intéressante pour répondre à cet objectif (Looft et al., 2012).

➤ Les conséquences de la présence de colistine et de bactéries résistantes dans le lisier sont encore mal connues. Dans l'environnement proche (lisier, déjections de chien et mouche) d'élevages porcins contenant des animaux positifs pour *mcr-1*, des souches porteuses de *mcr-1* ont été détectées, soulignant que la dissémination n'est pas à négliger (Guenther et al., 2017).

Une autre étude a montré que dans le lisier de poulets traités à la colistine, des plasmides étaient retrouvés jusque 6 semaines après stockage et que ces plasmides avaient la possibilité d'être transférés à des souches réceptrices (Le Devendec et al., 2016).

➤ Enfin, l'amélioration des facteurs permettant de baisser l'usage des antibiotiques en production animale (les pratiques d'hygiène, l'amélioration des conditions d'hébergement) sont à privilégier en premier lieu (Rhouma et al., 2016c). En outre, il est nécessaire d'évaluer les usages de colistine dans les autres productions animales, telle que la filière aviaire, où les taux de prévalence de *mcr-1* semblent plus forts que pour le porc (Abdul Momin et al., 2017; Perrin-Guyomard et al., 2016). Les modalités d'usage de la colistine dans ces filières devraient être investiguées.

- Concernant l'Homme, notre modèle expérimental chez le rat n'a pas mis en évidence de phénomène sélection de *E. coli* résistantes positives à *mcr-1*, après usage de colistine en SDD. A l'instar de ce qui a été trouvé chez le porc, les fortes concentrations digestives de colistine (largement supérieures à la CMI de notre souche) expliquent probablement ces résultats. Ces travaux préliminaires nécessitent confirmation sur un plus grand nombre d'animaux ainsi qu'en comparant des traitements à la colistine seule avec le traitement usuel complet de SDD (colistine, amphotéricine, tobramycine). L'usage de souches avec des CMI à la colistine plus fortes pourrait également être testé.

En plus de ces expérimentations animales, le suivi clinique de la dynamique de *mcr-1*, et de toutes les souches globalement résistantes à la colistine, est indispensable dans les hôpitaux ayant recours à la SDD. Une détection efficace des souches col-R est un prérequis indispensable à une bonne utilisation de la colistine en SDD et cette détection doit pouvoir être réalisée avec des méthodes rapides. Si les techniques classiques de culture bactérienne manquaient de sensibilité en raison des problèmes de mauvaise diffusion de la colistine dans certaines géloses, des récentes avancées ont permis de développer de nouveaux milieux qui semblent prometteurs pour détecter les entérobactéries col-R facilement et rapidement en routine (Abdul Momin et al., 2017; Nordmann et al., 2016). Dans notre étude, le milieu SuperPolymyxin s'est avéré être efficace pour discriminer les *E. coli* col-R et son utilisation à plus grande échelle permettrait de confirmer son efficacité. En outre, des techniques de PCR ont également été développées afin de détecter la présence de *mcr-1* directement à partir d'un

échantillon de fèces (Bontron et al., 2016; Chabou et al., 2016) et ces techniques restent réalisables en routine.

Les techniques de métagénomiques pourraient là aussi être utile pour mieux caractériser l'impact de ces traitements à la colistine sur la sélection des gènes de résistance aux antibiotiques (pas seulement *mcr-1*) dans l'ensemble du microbiote intestinal. Seule une étude s'est intéressée à ce sujet dans le contexte de la SDD (Buelow et al., 2014) et une augmentation de la proportion de gènes de résistance a été observée suite au traitement, mais avec une forte variabilité inter-individuelle. La diminution croissante du coût de ces méthodes devrait inciter à la réalisation d'études similaires sur un plus grand nombre de patients.

Concernant l'exploration pharmacocinétique du CMS et de la colistine après usage par voie systémique :

Un modèle PBPK pour le CMS et la colistine a été développé chez le porc grâce aux nombreuses données expérimentales plasmatiques, urinaires et tissulaires collectées. Ce modèle est inhabituel par rapport aux modèles PBPK plus classiques car les réactions de transformation et/ou d'élimination du CMS et de la colistine sont présentes dans tous les organes. Ce modèle semble donc être à ce jour le modèle le plus proche de la réalité physiologique de l'ADME de ces deux molécules. Les concentrations tissulaires mesurées ont démontré que la colistine s'accumule dans le rein des porcs lors d'administration répétées, ce qui peut être mis en lien avec les phénomènes de toxicité observés en pratique clinique chez l'Homme. En outre, ce modèle a permis de décrire de façon mécanistique la distribution et l'élimination de ces deux molécules, avec l'existence d'une sécrétion tubulaire forte de CMS (principalement responsable de l'élimination urinaire de CMS) et d'une réabsorption importante de colistine dans le rein avec ensuite une dégradation intra-rénale lente (liée à des liaisons intracellulaires). Une hypothèse de liaison de la colistine dans le compartiment sanguin est également avancée.

Le développement de ce modèle s'est heurté à plusieurs difficultés. En premier lieu, le fait de prendre en compte la colistine et sa pro-drogue a complexifié la structure du modèle et a nécessité la comparaison de nombreux modèles structuraux (plus d'une cinquantaine). L'usage de différents schémas posologiques de CMS (différentes doses et voies d'administration) a permis, d'une part, d'obtenir de nombreuses données expérimentales et ainsi d'enrichir le modèle mais, d'autre part, ces expérimentations ont révélé certaines discordances dans les concentrations obtenues, notamment au niveau rénal (illustré par la forte RV) et ont nécessité

des temps de runs importants (plusieurs jours lors de l'ajout des IIV malgré la parallélisation des cores des ordinateurs). En outre, l'obtention du modèle final a également été compliquée par le fait que l'état d'équilibre après les perfusions IV n'ait pas été atteint pour le rein, ce qui a rendu plus difficile l'ajustement du modèle aux données plasmatiques et rénales en même temps. Malgré ces limites, la méthodologie utilisée nous donne confiance dans la pertinence de ce modèle PBPK pour le CMS et la colistine chez le porc.

Plusieurs applications de ce modèle PBPK ont par la suite été explorées :

- L'estimation des temps d'attente pour des porcs traités avec du CMS par voie systémique a souligné l'intérêt des modèles PBPK en médecine vétérinaire, pour un objectif de sécurité alimentaire, comme le soulignent de plus en plus d'auteurs (Leavens et al., 2012; Lin et al., 2016; Yang et al., 2011). Cependant, il semble nécessaire de mener des expérimentations animales supplémentaires afin de confronter le temps d'attente prédit avec des données tissulaires rénales observées à ces temps-ci. En outre, l'approche de population (NLME) couplée au modèle PBPK utilisée dans cette étude est innovante car elle permet une estimation robuste des effets aléatoires (IIV et RV), ce qui est peu souvent réalisé dans un objectif de prédictions des temps d'attente. Les perspectives d'amélioration du modèle reposent sur le couplage avec d'autres approches de modélisation qui permettraient d'améliorer la valeur prédictive du modèle, comme par exemple la prise en compte de la variabilité des paramètres physiologiques inhérente à une population d'animaux (Li et al., 2017).

- Une approche d'extrapolation inter-âges et inter-espèces a été réalisée afin d'adapter le modèle PBPK aux populations humaines adultes et pédiatriques. Chez le porc et le porcelet, cette analyse a montré que l'influence de l'âge sur la PK de la colistine et du CMS est limitée sur la tranche d'âge des porcelets utilisés. Pour l'extrapolation inter-âges, une adaptation des paramètres estimés chez l'adulte proportionnellement au poids a suffi pour prédire la cinétique plasmatique et rénale chez l'individu juvénile. A contrario, pour l'extrapolation inter-espèces, une réestimation des paramètres précédemment estimés chez le porc a été nécessaire afin de décrire correctement les cinétiques plasmatiques et urinaires de CMS et de colistine chez le volontaire sain. Ceci souligne la limite dans l'extrapolation inter-espèces de ce modèle en lien avec le manque de connaissance sur l'ADME du CMS et de la colistine (exprimé plus bas). Cependant, ce modèle PBPK pourra être utile pour prédire les concentrations plasmatiques chez l'Homme. En outre, la plasticité des modèles PBPK permet de prendre en compte les altérations

physiologiques lors de conditions pathologiques, tel que des sepsis (Radke et al., 2017). Cet aspect pourrait à l'avenir être exploré afin de confronter le modèle avec les nombreuses données de cinétique plasmatique issues d'études avec des patients de réanimation traités avec du CMS (Garonzik et al., 2011; Grégoire et al., 2014; Karaiskos et al., 2015a; Plachouras et al., 2009), et ainsi le valider sur une population plus large d'individus.

Les simulations réalisées pour un enfant typique de 5 ans semblent montrer que les doses actuelles recommandées de CMS dans les populations pédiatriques sont probablement trop faibles pour obtenir des concentrations plasmatiques en colistine suffisantes et que la prise en compte de la fonction rénale est important. Il aurait été intéressant d'utiliser des porcelets plus jeunes, dont la physiologie se rapproche plus de celle d'un nourrisson chez l'Homme afin d'étudier l'impact d'une immaturité prononcée des fonctions physiologiques sur l'ADME du CMS et de la colistine. Cependant, les aspects techniques (logistique d'hébergement, etc...), réglementaires et éthiques rendent plus difficile la réalisation de telles procédures.

La simulation d'une population virtuelle d'enfants, comme il est possible de faire lors de l'évaluation de la capacité de prédiction d'un modèle PBPK chez l'adulte (Willmann et al., 2007), permettrait de généraliser à une population plus large. Cependant, les prédictions du modèle devront être confrontées avec des données cliniques chez l'enfant. Peu de données de cinétiques plasmatique de colistine ont été publiées à ce jour chez l'enfant alors que de telles données restent relativement aisées à obtenir. La réalisation de telles études cliniques est donc nécessaire à la validation de ce modèle. Ces résultats préliminaires apportent néanmoins des informations utiles et nouvelles qui peuvent avoir un impact sur l'usage de colistine en médecine humaine.

Un des points limitants majeurs de cette étude qui mériterait des investigations poussées est le manque de connaissances mécanistiques sur l'ADME du CMS et de la colistine. Ces informations auraient permis de mieux documenter le modèle et ainsi d'améliorer sa capacité prédictive. La détermination des mécanismes d'élimination de la colistine (enzyme(s) impliquée(s)) ainsi que les mécanismes rénaux impliqués dans l'excrétion/la sécrétion/la réabsorption semble fondamentale. L'identification des potentiels transporteurs rénaux impliqués dans la sécrétion de CMS grâce à des essais *in vitro* avec des modèles de vésicules modifiées sur-exprimant les transporteurs rénaux pourrait être explorée (Fekete et al., 2015). En outre, l'étude comparative de la vitesse de dégradation extra et intracellulaire de colistine au niveau rénal pourrait être évaluée grâce à des systèmes reproduisant la microphysiologie des cellules tubulaires rénales (Weber et al., 2016). Ces essais permettraient également de confirmer (ou d'infirmer)

qu'il n'y pas de transport de colistine directement entre la circulation sanguine et les cellules rénales. L'hypothèse de liaison vasculaire pourrait être explorée également, par exemple grâce à des études d'adsorption de la colistine à diverses matrices comme les érythrocytes ou l'endothélium vasculaire. Les mécanismes de fixation protéique du CMS et de la colistine sont également à déterminer. Seule l'AGP a été identifiée comme acteur important dans la liaison protéique à la colistine. L'influence de l'âge sur ce paramètre devra être pris en considération car la fraction libre plasmatique de la colistine est probablement différente pour les individus juvéniles en raison d'une concentration sérique plus faible en AGP (Lerman et al., 1989). Pour le CMS, l'identification des protéines impliquées dans ces liaisons n'a pas été réalisée à ce jour.

Enfin, des améliorations de la méthode analytique de dosage pour le CMS et la colistine semblent nécessaires. Le point majeur repose sur le développement d'une méthode directe de détection du CMS (et de ses différents dérivés partiels), afin de s'affranchir des problèmes de discrimination du CMS et de la colistine, notamment lors des dosages intracellulaires (comme pour le rein). Ces progrès permettraient en outre de faciliter la réalisation des expérimentations *in vitro* précédemment suggérées.

A l'avenir, ce modèle PBPK permettant de prédire le profil des concentrations tissulaires en colistine en fonction du temps pourrait également être combiné à un modèle pharmacocinétique-pharmacodynamique (PKPD), comme il en existe pour la colistine (Khan et al., 2016), permettant ainsi de prédire la décroissance bactérienne dans les différents organes/sites d'infection. Ce type de modélisation PBPK-PD, qui combine des informations *in vitro*, *in vivo* et cliniques, a déjà été développé avec succès pour la ciprofloxacine (Sadiq et al., 2016).

ANNEXE

Tableau S1 : Paramètres PK du CMS et de la colistine chez diverses espèces animales et l'Homme
(études effectuées à partir des années 2000, non exhaustif)

Espèce	Dose, voie et poids moyen/median	méthode	Paramètres PK		Références
			CMS	Colistine	
Rat	15 mg/kg CMS (IV)		CL _{CMS} = 11,7 ± 1,8 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0,30 ± 0,06 L/kg CL _{R_CMS} = 7,2 ± 2,2 mL/min/kg t _{1/2_CMS} = 23,6 ± 3,9 min fm = 6,8 %	t _{1/2_Coli} = 55,7 ± 19,3 min	(Li et al., 2004)
	1 mg/kg colistine (IV)	NCA		CL _{COLI} = 5,2 ± 0,4 mL/min/kg V _{SS_COLI} = 0,49 ± 0,062 L/kg t _{1/2_COLI} = 74,6 ± 13,2 min	(Li et al., 2003c)
	15 mg/kg CMS (IV) 1,5 mg/kg colistin (SC)	NCA	CL _{CMS} = 14,6 ± 3,6 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0,33 ± 0,075 mL/kg t _{1/2_CMS,IV} = 22,0 ± 3,4 min fm = 12,5 %	CL _{COLI} = 8,5 ± 1,0 mL/min/kg V _{SS_COLI} = 0,94 ± 0,25 L/kg t _{1/2_COLI_SC} = 75,4 ± 14,1 min t _{1/2_COLI_IV} = 35,5 ± 5,6 min	(Marchand et al., 2010a)
	5, 15, 30, 60, 120 mg/kg CMS (IV)	NCA	CL _{CMS} = 12,9 ± 3,6 mL/min/kg t _{1/2_CMS} = 23,5 ± 3,1 min fm = 10,2%	t _{1/2_COLI} = 37,6 ± 6,5 min	(Marchand et al., 2010b)
	0,5 mg/kg colistine (IV)	NCA		CL _{COLI} = 4,28 ± 0,93 mL/min/kg V _{d_COLI} = 0,396 ± 0,107 L/kg t _{1/2_COLI} = 67,8 ± 6,6 min	(Yousef et al., 2011)
	0,35 mg/kg colistine (IV) 324 ± 24 g	NLME ^a		CL _{COLI} = 7,2 mL/min/kg V _{CENTRAL} = 0,19 L/kg V _{PERIPH} = 0,19 L/kg	(Gontijo et al., 2014)

Souris	15 mg/kg CMS (SC)	NCA	CL _{CMS} = 22,2 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 1,03 L/kg t _{1/2_CMS} = 33,0 min	t _{1/2_COLI} = 33,0 min	(Bouchene, 2016)
Souris (neutropéniques)	2,64 mg/kg colistine (IV)	NCA		CL _{COLI} = 7,46 mL/min/kg V _{d_COLI} = 0,40 L/kg t _{1/2_COLI} = 37,1 min	(Lin et al., 2017)
Lapin	15 mg/kg CMS (IV) 2.2 kg	NCA	CL _{CMS} = 2,5 ± 0,13 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0,13 ± 0,0016 L/kg t _{1/2_CMS} = 43,0 ± 3,5 min	t _{1/2_COLI} = 80,8 ± 8,3min	(Bouchene, 2016)
Porcs	3,5 mg/kg CMS (IV) 46 kg	NCA	CL _{CMS} = 2,7 ± 0,8 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0,25 ± 0,088 L/kg t _{1/2_CMS} = 50,9 ± 4,2 min	t _{1/2_COLI} = 129 ± 0,4 min	(Bouchene, 2016)
Porcs (avec pneumonie)	3,2 mg/kg CMS (IV, toutes les 8h) 20 ± 2 kg	NCA		CL _{COLI/fm} = 4,92 ± 1,67 mL/min/kg V _{d_COLI/fm} = 0,75 ± 0,39 L/kg t _{1/2_COLI} = 1,7 ± 0,4 h	(Lu et al., 2010)
Mouton	4 mg/kg CMS (IV) 3 mg/kg colistine (IV) 34 – 43kg	NCA	CL _{CMS} = 0.95 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 1,17 L/kg t _{1/2_CMS} = 14,2 ± 3,8 h fm = 17,4 ± 5,6 %	CL _{COLI/fm} = 0.55 mL/min/kg V _{SS_COLI} = 0,62 L/kg t _{1/2_COLI} = 14,3 ± 2,3 h	(Landersdorfer et al., 2017)
Babouin	2,5 mg/kg CMS (IV) 0,379-0,485 mg/kg col- istine (IV) 10 – 13kg	NCA	CL _{CMS} = 2,6 ± 0,8 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0,152 ± 0,020 L/kg t _{1/2_CMS} = 38,5 ± 7,6 min	t _{1/2_COLI} = 130 ± 15 min	(Marchand et al., 2015)
Homme (patients atteints de mucoviscidose)	160 mg toutes les 8h pour les patients > 50 kg 80 mg toutes les 8h pour les patients < 50 kg (IV)	NCA	CL _{CMS} = 2,0 ± 0,5 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0,34 ± 0,095 L/kg t _{1/2_CMS} = 2,1 ± 0,9 h	t _{1/2_COLI} = 4,2 ± 1,3 h	(Li et al., 2003a)

Homme (patients critiques, sans altérations de la fonction rénale)	240 mg en IV toutes les 8h 82 ± 13,7 kg	NLME ^b	CL _{CMS} = 2,8 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0.16 L/kg t _{1/2_CMS_α} = 0,046 h t _{1/2_CMS_β} = 2,3 h	CL _{COLI/fm,coli} = 1,8 mL/min/kg V _{SS_COLI/fm,coli} = 2,3 L/kg t _{1/2_COLI} = 14,4 h	(Plachouras et al., 2009)
Homme (Volontaires sains)	80 mg CMS en IV 72,7 ± 9,1 kg,	NLME ^b	CL _{CMS} = 2,0 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0.19 L/kg t _{1/2_CMS_α} = 0,49 h t _{1/2_CMS_β} = 2,0 h fm = 30 %	CL _{COLI/fm} = 0,66 mL/min/kg V _{SS_COLI/fm} = 0,17 L/kg t _{1/2_COLI} = 3 h	(Couet et al., 2011)
Homme (patients de réanima- tion)	De 75 à 410 mg CMS/jour en IV à des in- tervalles de 8 à 24h 59,1 kg (30,0–106,4)	NLME ^b	CL _{CMS} = 1,0 mL/min/kg V _{CENTRAL} = 0,19 L/kg V _{PERIPH} = 0,32 L/kg t _{1/2_CMS} = 11 h si CL _{CREAT} <10 ; 5,6 h si CL _{CREAT} entre 11 et 69 ; 4,6 h si CL _{CREAT} >70 mL/min/1.73 m ²	CL _{COLI/fm} = 0,77 mL/min/kg V _{SS_COLI/fm} = 0,76 L/kg t _{1/2_COLI} = 13 h si CL _{CREAT} <10 ;13 h si CL _{CREAT} entre 11 et 69 ; 9,1 h si CL _{CREAT} >70 mL/min/1.73 m ²	(Garonzik et al., 2011)
Homme (patients de réanima- tion)	Dose de charge de 480 mg CMS puis 80 à 240 mg CMS toutes les 8h en IV 81 ± 22 kg	NLME ^b	CL _{CMS} = 2,7 mL/min/kg V _{CENTRAL} = 0,14 L/kg V _{PERIPH} = 0,35 L/kg t _{1/2_CMS_α} = 0,026 h t _{1/2_CMS_β} = 2,2 h	CL _{COLI/fm} = 1,7 mL/min/kg V _{SS_COLI/fm} = 2,7 L/kg t _{1/2_COLI} = 18,5 h	(Mohamed et al., 2012)
Homme (patients de réanima- tion)	Non précisé 76 kg (40–175)	NLME ^c	CL _{CMS} = 0,90 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0.21 L/kg t _{1/2_CMS} = 1,6 h	CL _{COLI/fm} = 0,49 mL/min/kg V _{SS_COLI/fm} = 0,13 L/kg t _{1/2_COLI} = 3,1 h	(Grégoire et al., 2014)
Homme (patients de réanima- tion)	160 mg CMS toutes les 8h (IV sauf la 1 ^{ère} en né- bulisation) 79 ±17 kg	NLME ^c	CL _{CMS} = 1,4 mL/min/kg V _{SS_CMS} = 0,19 L/kg t _{1/2_CMS} = 1,6 h	CL _{COLI/fm} = 0,67 mL/min/kg V _{SS_COLI/fm} = 0,17 L/kg t _{1/2_COLI} = 2,9 h	(Boisson et al., 2014)

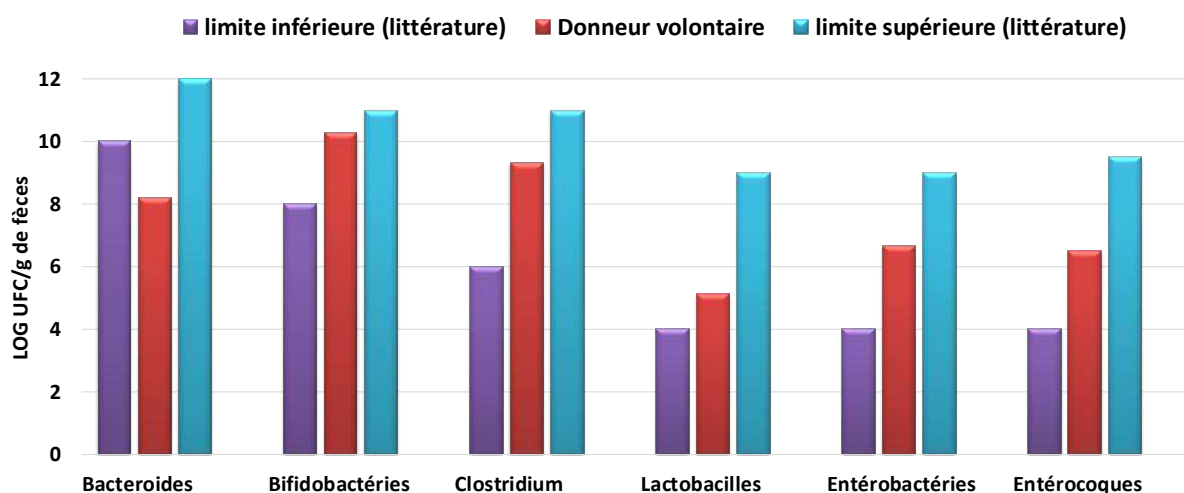
Homme (patients de réanimation, avec légère atteinte de la fonction rénale)	Dose de charge de 9 MIU puis 4,5 MUI toutes les 12h (IV) 78 ± 20 kg	NLME ^b	CL _{CMS} = 1,24 mL/min/kg V _{CENTRAL} = 0,018 L/kg V _{PERIPH} = 0,16 L/kg t _{1/2_CMS} = 1,7 h	CL _{COLI/fm} = 1,0 mL/min/kg V _{SS_COLI/fm} = 1,01 L/kg t _{1/2_COLI} = 11,2 h	(Karaikos et al., 2015b)
7 nouveaux-nés (patients de réanimation)	12 mg CMS/kg (IV) Age médian : 13 jr 2,9 ± 0,9 kg	NCA		CL _{COLI/fm} = 10 ± 5 mL/min/kg V _{SS_COLI/fm} = 7,7 ± 9,3 L/kg t _{1/2_COLI} = 9.0 ± 6.5 h	(Nakwan et al., 2016)

fm : fraction de la dose de CMS administrée convertie en colistine., fm,coli :fraction de la dose de CMS non excrétée dans les urines et convertie en colistine ; IV : intraveineuse, SC : sous-cutané, NCA : analyse non-compartimentale, NLME : approche de population en non-linéaire à effet mixte, CL_{COLI} : clairance totale de colistine ; CL_{COLI/fm} : clairance totale de la colistine formée ; Vd/V_{SS} : volume de distribution. Les données des patients hémodialysés n'ont pas été prises en compte. Pour les approches de types NLME, seules les valeurs typiques sont données

^a bi-compartiment colistine) ; ^b bi-compartiment CMS, monocompartiment colistine, ^c mono-compartiment CMS et colistine

Tableau S2 : Milieux utilisés pour le dénombrement des populations bactériennes

Populations bactériennes cible	Milieux de culture	Fournisseurs	Conditions d'incubation
Bacteroides	Gélose Bacteroides Bile Esculin (BBE)	BD, Le Pont de Claix, France	Anaérobiose, 37°C
Clostridium	Gélose Columbia supplémentée avec : 1. Cystéine 160 mg/L 2. Colistine sulphate 10mg/L 3. Rouge neutre 40mg/L 4. Lait entier 5% 5. Sang de mouton 5%	- Biomerieux, Marcy l'Etoile, France - Sigma	Anaérobiose, 37°C
Bifidobactéries	Gélose Bifidobacterium Modified	BD	Anaérobiose, 37°C
Lactobacilles	Gélose Lactobacillus Selection	BD	Aérobiose + CO ₂ , 37°C
Entérobactéries	Gélose MacConkey	ThermoFisher Scientific, Dardilly, France	Aérobiose, 37°C
Entérocoques	Gélose Cocosel	Biomerieux,	Aérobiose, 37°C

Figure S1: Quantification des populations bactériennes cultivable du microbiote intestinal du donneur

REFERENCES

- Abdelraouf K, Braggs KH, Yin T, Truong LD, Hu M and Tam VH (2012) Characterization of Polymyxin B-Induced Nephrotoxicity: Implications for Dosing Regimen Design. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**:4625-4629.
- Abdelraouf K, Chang K-T, Yin T, Hu M and Tam VH (2014) Uptake of polymyxin B into renal cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**:4200-4202.
- Abdul Momin MHF, Bean DC, Hendriksen RS, Haenni M, Phee LM and Wareham DW (2017) CHROMagar COL-APSE: a selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. *Journal of Medical Microbiology*.
- Abe M, Shimizu K, Ouchi M and Matsumoto T (1976) Studies on sodium colistin methane sulfonate (CL-M) on metabolism in the urine and bile of rabbits. *Chemotherapy* **24**:1592-1596.
- Ah Y-M, Kim A-J and Lee J-Y (2014) Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **44**:8-15.
- Al-Tawfiq JA, Laxminarayan R and Mendelson M (2017) How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *International Journal of Infectious Diseases* **54**:77-84.
- Alan S, Yildiz D, Erdeve O, Cakir U, Kahvecioglu D, Okulu E, Ates C, Atasay B and Arsan S (2014) Efficacy and safety of intravenous colistin in preterm infants with nosocomial sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*. *American journal of perinatology* **31**:1079-1086.
- Anderson B and Holford N (2008) Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:303-332.
- Anderson BJ and Holford NH (2011) Tips and traps analyzing pediatric PK data. *Pediatric Anesthesia* **21**:222-237.
- Andraud M, Rose N, Laurentie M, Sanders P, Le Roux A, Cariolet R, Chauvin C and Jouy E (2011) Estimation of transmission parameters of a fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strain between pigs in experimental conditions. *Veterinary research* **42**:1-7.
- Anses (2016a) Avis relatif à la saisine n°2016-SA-0160 concernant l'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire., in Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail.
- Anses (2016b) Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales - Bilan 2015. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail.
- Antachopoulos C and Iosifidis E (2017) Colistin Use in Neonates and Children With Infections Due to Carbapenem-resistant Bacteria. *The Pediatric infectious disease journal* **36**:905-907.
- Arslan BY, Arslan F, Erkalp K, Alagöl A, Sevdı MS, Yıldız G, Küçük SH and Altınay S (2016) Luteolin ameliorates colistin-induced nephrotoxicity in the rat models. *Renal Failure*:1-6.
- Azad MA, Akter J, Rogers K, Nation RL, Velkov T and Li J (2015a) Major pathways of polymyxin-induced apoptosis in rat kidney proximal tubular cells. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Azad MA, Huang JX, Cooper MA, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, Li J and Velkov T (2012) Structure-activity relationships for the binding of polymyxins with human α -1-acid glycoprotein. *Biochemical pharmacology* **84**:278-291.
- Azad MA, Roberts KD, Yu HH, Liu B, Schofield AV, James SA, Howard DL, Nation RL, Rogers K and de Jonge MD (2015b) Significant accumulation of polymyxin in single renal tubular cells: a medicinal chemistry and triple correlative microscopy approach. *Analytical chemistry* **87**:1590-1595.

- Azad MAK, Finnin BA, Poudyal A, Davis K, Li J, Hill PA, Nation RL, Velkov T and Li J (2013) Polymyxin B Induces Apoptosis in Kidney Proximal Tubular Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**:4329-4335.
- Ballard P, Leahy DE and Rowland M (2000) Prediction of in vivo tissue distribution from in vitro data 1. Experiments with markers of aqueous spaces. *Pharmaceutical research* **17**:660-663.
- Barrett JS, Della Casa Alberighi O, Laer S and Meibohm B (2012) Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling in Children. *Clin Pharmacol Ther* **92**:40-49.
- Bassetti M and Righi E (2014) SDD and colistin resistance: end of a dream? *Intensive care medicine* **40**:1066.
- Bastin A and Ryanna K (2009) Use of selective decontamination of the digestive tract in United Kingdom intensive care units*. *Anaesthesia* **64**:46-49.
- Beal SL (2001) Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* **28**:481-504.
- Beceiro A, Moreno A, Fernández N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, Harper M, Boyce JD and Bou G (2014) Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**:518-526.
- Bergen PJ, Landersdorfer CB, Lee HJ, Li J and Nation RL (2012) ‘Old’antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. *Current opinion in infectious diseases* **25**:626.
- Bergen PJ, Li J, Rayner CR and Nation RL (2006) Colistin Methanesulfonate Is an Inactive Prodrug of Colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**:1953-1958.
- Beringer P (2001) The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine* **7**:434-440.
- Bernasconi OJ, Kuenzli E, Pires J, Tinguely R, Carattoli A, Hatz C, Perreten V and Endimiani A (2016) Travelers can import colistin-resistant Enterobacteriaceae, including those possessing the plasmid-mediated mcr-1 gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**:5080-5084.
- Bi Z, Berglund B, Sun Q, Nilsson M, Chen B, Tärnberg M, Ding L, Lundborg CS, Bi Z and Tomson G (2017) Prevalence of the mcr-1 colistin resistance gene in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from human faecal samples collected in 2012 in rural villages in Shandong Province, China. *International Journal of Antimicrobial Agents* **49**:493-497.
- Bion J, Taylor N, Petros A, Silvestri L and van Saene H (2012) Selective digestive decontamination and antibiotic resistance. *The Lancet Infectious diseases* **12**:181.
- Bode G, Clausen P, Gervais F, Loegsted J, Luft J, Nogues V and Sims J (2010) The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **62**:196-220.
- Boisson M, Jacobs M, Grégoire N, Gobin P, Marchand S, Couet W and Mimoz O (2014) Comparison of intra-pulmonary and systemic pharmacokinetics of colistinmethansulphonate (CMS) and colistin after aerosol delivery and intravenous administration of CMS in critically ill patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Bonten MJM (2006) Selective Digestive Tract Decontamination—Will It Prevent Infection with Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens but Still Be Applicable in Institutions where Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci Are Endemic? *Clinical Infectious Diseases* **43**:S70-S74.
- Bontron S, Poirel L and Nordmann P (2016) Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (mcr-1) from cultured bacteria and stools. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **71**:2318-2320.

- Bouchene S (2013) Comparison of Colistin and Colistimethate sodium (CMS) Model-Predicted Whole-Body Distribution with Measured Tissue:Plasma Concentrations Ratios in Rats, in 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Denver, CO.
- Bouchene S (2016) Physiologically Based Pharmacometric Models for Colistin and the Immune Response to Bacterial Infection, *Acta Universitatis Upsaliensis*.
- Bouzom F, Ball K, Perdaems N and Walther B (2012) Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling tools: how to fit with our needs? *Biopharmaceutics & drug disposition* **33**:55-71.
- Boyen F, Vangroenweghe F, Butaye P, De Graef E, Castryck F, Heylen P, Vanrobaeys M and Haesebrouck F (2010) Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary microbiology* **144**:359-362.
- Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR and Beliles RP (1997) Physiological Parameter Values for Physiologically Based Pharmacokinetic Models. *Toxicology and Industrial Health* **13**:407-484.
- Brun-Buisson C, Legrand P and Rauss A Intestinal decontamination for control of nosocomial multiresistant gram-negative bacilli. Study of an outbreak in an intensive care unit.
- Buelow E, Gonzalez TB, Versluis D, Oostdijk EA, Ogilvie LA, van Mourik MS, Oosterink E, van Passel MW, Smidt H and D'andrea MM (2014) Effects of selective digestive decontamination (SDD) on the gut resistome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**:2215-2223.
- Çağan E, Baş EK and Asker HS (2017) Use of Colistin in a Neonatal Intensive Care Unit: A Cohort Study of 65 Patients. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* **23**:548.
- Cajal Y, Rogers J, Berg OG and Jain MK (1996) Intermembrane molecular contacts by polymyxin B mediate exchange of phospholipids. *Biochemistry* **35**:299-308.
- Callens B, Persoons D, Maes D, Laanen M, Postma M, Boyen F, Haesebrouck F, Butaye P, Catry B and Dewulf J (2012) Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive veterinary medicine* **106**:53-62.
- Canter R, Harvey S, Harrison D, Campbell M, Rowan K, Cuthbertson B, Duncan E, Prior M, Bellingan G and Campbell M (2014) Observational study of current use of selective decontamination of the digestive tract in UK critical care units. *British journal of anaesthesia* **113**:610-617.
- Cao Y and Jusko WJ (2012) Applications of minimal physiologically-based pharmacokinetic models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* **39**:711-723.
- Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G and Magistrali CF (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* **22**.
- Castanheira M, Griffin MA, Deshpande LM, Mendes RE, Jones RN and Flamm RK (2016) Detection of mcr-1 among *Escherichia coli* clinical isolates collected worldwide as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in 2014 and 2015. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**:5623-5624.
- Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Lopez Navas A, Mackay D, Magiorakos AP, Moreno Romo MA, Moulin G, Munoz Madero C, Matias Ferreira Pomba MC, Powell M, Pyorala S, Rantala M, Ruzauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Torneke K, van Duikeren E and Torren Edo J (2015) Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents* **46**:297-306.
- Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM and Guardabassi L (2008) Selection and Persistence of CTX-M-Producing *Escherichia coli* in the Intestinal Flora of Pigs Treated with Amoxicillin, Ceftiofur, or Cefquinome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**:3612-3616.

- Celebi S, Hacimustafaoglu M, Koksall N, Ozkan H and Çetinkaya M (2010) Colistimethate sodium therapy for multidrug-resistant isolates in pediatric patients. *Pediatrics International* **52**:410-414.
- Chabou S, Leangapichart T, Okdah L, Le Page S, Hadjadj L and Rolain J-M (2016) Real-time quantitative PCR assay with Taqman® probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New microbes and new infections* **13**:71-74.
- Chauvin C (2010) Etude des acquisitions de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques dans un échantillon d'élevages porcins naisseurs-engraisseurs année 2008 et comparaison 2008/2005, Anses.
- Cheah S-E, Wang J, Nguyen VTT, Turnidge JD, Li J and Nation RL (2015) New pharmacokinetic/pharmacodynamic studies of systemically administered colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in mouse thigh and lung infection models: smaller response in lung infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**:3291-3297.
- Chiu WA, Barton HA, DeWoskin RS, Schlosser P, Thompson CM, Sonawane B, Lipscomb JC and Krishnan K (2007) Evaluation of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Journal of Applied Toxicology* **27**:218-237.
- Christensen EI, Verroust PJ and Nielsen R (2009) Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* **458**:1039-1048.
- Claus BM, Snauwaert S, Haerynck F, Van Daele S, De Baets F and Schelstraete P (2015) Colistin and neurotoxicity: recommendations for optimal use in cystic fibrosis patients. *Int J Clin Pharm*:1-4.
- Clausell A, Garcia-Subirats M, Pujol M, Busquets MA, Rabanal F and Cajal Y (2007) Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. *The journal of physical chemistry B* **111**:551-563.
- Couet W, Gregoire N, Gobin P, Saulnier P, Frasca D, Marchand S and Mimoz O (2011) Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **89**:875-879.
- Craigmill A (2003) A physiologically based pharmacokinetic model for oxytetracycline residues in sheep. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **26**:55-63.
- Dai C, Li J, Tang S, Li J and Xiao X (2014) Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:4075-4085.
- Daneman N, Sarwar S, Fowler RA and Cuthbertson BH (2013) Effect of selective decontamination on antimicrobial resistance in intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* **13**:328-341.
- Darwich AS, Pade D, Ammori BJ, Jamei M, Ashcroft DM and Rostami-Hodjegan A (2012) A mechanistic pharmacokinetic model to assess modified oral drug bioavailability post bariatric surgery in morbidly obese patients: interplay between CYP3A gut wall metabolism, permeability and dissolution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **64**:1008-1024.
- de Jonge E, Schultz MJ, Spanjaard L, Bossuyt PMM, Vroom MB, Dankert J and Kesecioglu J (2003) Effects of selective decontamination of digestive tract on mortality and acquisition of resistant bacteria in intensive care: a randomised controlled trial. *The Lancet* **362**:1011-1016.
- Denervaud Tendon V, Poirel L and Nordmann P (2017) Transferability of the mcr-1 Colistin Resistance Gene. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*.
- Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, De Angelis LH, Fortunato S, Giani T, Menichetti F and Rossolini GM (2016) mcr-1.2, a new mcr variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**:5612-5615.

- Dixon RA and Chopra I (1986) Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **29**:781-788.
- Dortet L, Bonnin R, Jousset A, Gauthier L and Naas T (2016) Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries: une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance! *Journal des Anti-infectieux* **18**:139-159.
- Dubbelboer IR, Lilienberg E, Sjögren E and Lennernas H (2017) A model-based approach to assessing the importance of intracellular binding sites in doxorubicin disposition. *Molecular Pharmaceutics* **14**:686-698.
- Durante-Mangoni E, Del Franco M, Andini R, Bernardo M, Giannouli M and Zarrilli R (2015) Emergence of colistin resistance without loss of fitness and virulence after prolonged colistin administration in a patient with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.
- Eadon MT, Hack BK, Alexander JJ, Xu C, Dolan ME and Cunningham PN (2013) Cell cycle arrest in a model of colistin nephrotoxicity. *Physiological genomics* **45**:877-888.
- ECDC (2016a) Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae - RAPID RISK ASSESSMENT, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm: ECDC.
- ECDC (2016b) Summary of latest data on antibiotic resistance in the European Union, November 2016, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm: ECDC.
- Edginton AN, Schmitt W and Willmann S (2006) Development and evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for children. *Clinical pharmacokinetics* **45**:1013-1034.
- Edginton AN, Shah B, Sevestre M and Momper JD (2013) The integration of allometry and virtual populations to predict clearance and clearance variability in pediatric populations over the age of 6 years. *Clinical pharmacokinetics* **52**:693-703.
- Edginton AN and Willmann S (2006) Physiology-based versus allometric scaling of clearance in children; an eliminating process based comparison. *Paediatric and Perinatal Drug Therapy* **7**:146-153.
- EFSA and ECDC (2017) The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015., in EFSA Journal 2017 (2017 EJ ed), EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control).
- EMA (1996) Approach toward harmonisation of withdrawal periods, European Medicines Agency (EMA) - Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP).
- EMA (2014) European Medicines Agency completes review of polymyxin-based medicines : Recommendations issued for safe use in patients with serious infections resistant to standard antibiotics, European Medicines Agency (EMA).
- EMA (2015) Avis suite à saisine formée sur le fondement de l'article 35 concernant les médicaments vétérinaires contenant de la colistine à administrer par voie orale, European Medicines Agency (EMA).
- EMA (2016a) Guideline on approach towards harmonisation of withdrawal periods, European Medicines Agency (EMA) - Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP).
- EMA (2016b) Guideline on the qualification and reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation DRAFT, European Medicines Agency (EMA).
- EMA (2016c) Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014, European Medicines Agency (EMA).

- EMA (2016d) Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health., European Medicines Agency (EMA).
- Emoto C, Fukuda T, Johnson T, Adams D and Vinks A (2015) Development of a pediatric physiologically based pharmacokinetic model for sirolimus: applying principles of growth and maturation in neonates and infants. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* **4**:127-134.
- Eskild-Jensen A, Jacobsen L, Christensen H, Frokiaer J, Jorgensen HS, Djurhuus JC and Jorgensen TM (2001) Renal function outcome in unilateral hydronephrosis in newborn pigs. II. Function and volume of contralateral kidneys. *J Urol* **165**:205-209.
- Espié P, Tytgat D, Sargentini-Maier M-L, Poggessi I and Watelet J-B (2009) Physiologically based pharmacokinetics (PBPK). *Drug Metabolism Reviews* **41**:391-407.
- EUCAST (2016) Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Published on www.eucast.org **22**.
- Evans ME, Feola DJ and Rapp RP (1999) Polymyxin B Sulfate and Colistin: Old Antibiotics for Emerging Multiresistant Gram-Negative Bacteria. *Annals of Pharmacotherapy* **33**:960-967.
- Falagas ME and Kasiakou SK (2006) Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care* **10**:R27.
- Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaiou DK, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Nikita D and Michalopoulos A (2010) Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* **35**:194-199.
- Falagas ME, Sideri G, Vouloumanou EK, Papadatos JH and Kafetzis DA (2009a) Intravenous colistimethate (colistin) use in critically ill children without cystic fibrosis. *The Pediatric infectious disease journal* **28**:123-127.
- Falagas ME, Vouloumanou EK and Rafailidis PI (2009b) Systemic colistin use in children without cystic fibrosis: a systematic review of the literature. *International journal of antimicrobial agents* **33**:503. e501-503. e513.
- Fekete Z, Rajnai Z, Nagy T, Jakab KT, Kurunczi A, Gémes K, Herédi-Szabó K, Fülöp F, Tóth GK and Czerwinski M (2015) Membrane assays to characterize interaction of drugs with ABCB1. *The Journal of membrane biology* **248**:967-977.
- Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, Lopes R, Otutumi LK, Gonçalves DD and Dropa M (2016) Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Eurosurveillance* **21**.
- Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I and Hancock REW (2010) Adaptive Resistance to the “Last Hope” Antibiotics Polymyxin B and Colistin in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by the Novel Two-Component Regulatory System ParR-ParS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:3372-3382.
- Fiaccadori E, Antonucci E, Morabito S, d’Avolio A, Maggiore U and Regolisti G (2016) Colistin Use in Patients With Reduced Kidney Function. *American Journal of Kidney Diseases*.
- Fisher DM and Shafer SL (2016) Allometry, Shallometry! *Anesthesia & Analgesia* **122**:1234-1238.
- Fleury M (2015) Impact de traitements antibiotiques sur la flore digestive du porcelet: Etude in vivo et développement d'une approche en système de fermentation in vitro, Rennes 1.
- Fleury MA, Jouy E, Eono F, Cariolet R, Couet W, Gobin P, Le Goff O, Blanquet-Diot S, Alric M and Kempf I (2016) Impact of two different colistin dosing strategies on healthy piglet fecal microbiota. *Research in Veterinary Science* **107**:152-160.

- Folgori L, Bielicki J, Heath PT and Sharland M (2017) Antimicrobial-resistant Gram-negative infections in neonates: burden of disease and challenges in treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*.
- Forrest A, Garonzik SM, Thamlikitkul V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Paterson DL, Li J, Silveira FP and Nation RL (2017) Pharmacokinetic/toxicodynamic analysis of colistin-associated acute kidney injury in critically ill patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*:AAC. 01367-01317.
- Friis C (1980) Postnatal development of the pig kidney: ultrastructure of the glomerulus and the proximal tubule. *Journal of anatomy* **130**:513.
- Friis C (1983) Renal excretion of drugs during postnatal development in piglets. *Veterinary research communications* **7**:349-352.
- Furet J-P, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Doré J and Corthier G (2009) Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR.
- Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J, Silveira FP, Forrest A and Nation RL (2011) Population Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate and Formed Colistin in Critically Ill Patients from a Multicenter Study Provide Dosing Suggestions for Various Categories of Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**:3284-3294.
- Gasthuys E, Vandecasteele T, De Bruyne P, Vande Walle J, De Backer P, Cornillie P, Devreese M and Croubels S (2016) The Potential Use of Piglets as Human Pediatric Surrogate for Preclinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Drug Testing. *Current pharmaceutical design* **22**:4069-4085.
- Gelman A, Bois F and Jiang J (1996) Physiological pharmacokinetic analysis using population modeling and informative prior distributions. *Journal of the American Statistical Association* **91**:1400-1412.
- Giamarellou H (2016) Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *International journal of antimicrobial agents* **48**:614-621.
- Gobin P, Lemaître F, Marchand S, Couet W and Olivier J-C (2010) Assay of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Plasma and Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:1941-1948.
- Gontijo AVL, Grégoire N, Lamarche I, Gobin P, Couet W and Marchand S (2014) Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 2. Colistin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**:3950-3956.
- Goverman J, Weber JM, Keaney TJ and Sheridan RL (2007) Intravenous colistin for the treatment of multi-drug resistant, gram-negative infection in the pediatric burn population. *Journal of burn care & research* **28**:421-426.
- Gregoire N, Aranzana-Climent V, Magreault S, Marchand S and Couet W (2017) Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clinical pharmacokinetics*.
- Grégoire N, Mimoz O, Mégarbane B, Comets E, Chatelier D, Lasocki S, Gauzit R, Balayn D, Gobin P, Marchand S and Couet W (2014) New colistin population pharmacokinetic data in critically ill patients suggesting an alternative loading dose rational. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Gruskin AB, Edelmann CM and Yuan S (1970) Maturational changes in renal blood flow in piglets. *Pediatric research* **4**:7-13.
- Guenther S, Falgenhauer L, Semmler T, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Roesler U and Roschanski N (2017) Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**:1289-1292.

- Haenni M, Métayer V, Gay E and Madec J-Y (2016) Increasing trends in mcr-1 prevalence among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from French calves despite decreasing exposure to colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**:6433-6434.
- Halaby T, al Naiemi N, Kluytmans J, van der Palen J and Vandenbroucke-Grauls CMJE (2013) Emergence of colistin resistance in Enterobacteriaceae after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Hall C, Lueshen E, Mořat A and Linninger AA (2012) Interspecies scaling in pharmacokinetics: A novel whole-body physiologically based modeling framework to discover drug biodistribution mechanisms in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **101**:1221-1241.
- He H, Li J-C, Nation RL, Jacob J, Chen G, Lee HJ, Tsuji BT, Thompson PE, Roberts K, Velkov T and Li J (2013) Pharmacokinetics of four different brands of colistimethate and formed colistin in rats. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**:2311-2317.
- Hémonic A, Chauvin C, Corrége I, Guinaudeau J, Soyer J, Berthelot N, Delzescaux D and Verliat F (2013) Mise au point d'un outil de suivi des usages d'antibiotiques dans la filière porcine. 45e

- Iosifidis E, Antachopoulos C, Ioannidou M, Mitroudi M, Sdougka M, Drossou-Agakidou V, Tsivitanidou M and Roilides E (2010) Colistin administration to pediatric and neonatal patients. *European journal of pediatrics* **169**:867-874.
- İpek MS, Aktar F, Okur N, Celik M and Ozbek E (2017) Colistin use in critically ill neonates: A case–control study. *Pediatrics & Neonatology*.
- Jajoo M, Kumar V, Jain M, Kumari S and Manchanda V (2011) Intravenous colistin administration in neonates. *The Pediatric infectious disease journal* **30**:218-221.
- Jansson B, Karvanen M, Cars O, Plachouras D and Friberg LE (2009) Quantitative analysis of colistin A and colistin B in plasma and culture medium using a simple precipitation step followed by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **49**:760-767.
- Jayol A, Nordmann P, Brink A and Poirel L (2015) Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*:AAC. 05055-05014.
- JECFA (2006) Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 66th Meeting 2006, Food & Agriculture Org.
- Johnson TN (2008) The problems in scaling adult drug doses to children. *Archives of disease in childhood* **93**:207-211.
- Johnson TN and Rostami-Hodjegan A (2011) Resurgence in the use of physiologically based pharmacokinetic models in pediatric clinical pharmacology: parallel shift in incorporating the knowledge of biological elements and increased applicability to drug development and clinical practice. *Pediatric Anesthesia* **21**:291-301.
- Johnson TN, Rostami-Hodjegan A and Tucker GT (2006) Prediction of the clearance of eleven drugs and associated variability in neonates, infants and children. *Clinical pharmacokinetics* **45**:931-956.
- Jones H and Rowland-Yeo K (2013) Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* **2**:e63.
- Kagan L, Gershkovich P, Wasan KM and Mager DE (2011) Physiologically based pharmacokinetic model of amphotericin B disposition in rats following administration of deoxycholate formulation (Fungizone®): pooled analysis of published data. *The AAPS journal* **13**:255-264.
- Karaiskos I, Friberg LE, Pontikis K, Ioannidis K, Tsagkari V, Galani L, Kostakou E, Baziaka F, Paskalis C and Koutsoukou A (2015a) Colistin Population Pharmacokinetics after Application of a Loading Dose of 9 MU Colistin Methanesulfonate (CMS) in Critically Ill Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*:AAC. 00554-00515.
- Karaiskos I, Friberg LE, Pontikis K, Ioannidis K, Tsagkari V, Galani L, Kostakou E, Baziaka F, Paskalis C, Koutsoukou A and Giamarellou H (2015b) Colistin Population Pharmacokinetics after Application of a Loading Dose of 9 MU Colistin Methanesulfonate in Critically Ill Patients. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:7240-7248.
- Karbuz A, Özdemir H, Yaman A, Kocabas BA, Ödek Ç, Güriz H, Aysev AD, Çiftçi E, Kendirli T and Ates C (2014) The use of colistin in critically ill children in a pediatric intensive care unit. *The Pediatric infectious disease journal* **33**:e19-e24.
- Karvanen M, Malmberg C, Lagerbäck P, Friberg LE and Cars O (2017) Colistin is Extensively Lost during Standard in Vitro Experimental Conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Katsunuma Y, Hanazumi M, Fujisaki H, Minato H, Hashimoto Y and Yonemochi C (2007a) Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology* **53**:273-279.
- Katsunuma Y, Hanazumi M, Fujisaki H, Minato H, Hashimoto Y and Yonemochi C (2007b) Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence

- of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *The Journal of general and applied microbiology* **53**:273-279.
- Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL and Li J (2016) Agents of Last Resort. *Infectious Disease Clinics* **30**:391-414.
- Kelesidis T and Falagas ME (2015) The safety of polymyxin antibiotics. *Expert opinion on drug safety*:1-15.
- Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, Madec J-Y and Jouy E (2013) What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *International Journal of Antimicrobial Agents* **42**:379-383.
- Kempf I, Jouy E and Chauvin C (2016) Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *International journal of antimicrobial agents* **48**:598-606.
- Kesecioglu J and Eggimann P (2016) What is new in selective decontamination of the digestive tract? *Intensive care medicine* **42**:1270-1275.
- Khalil F and Laer S (2011) Physiologically based pharmacokinetic modeling: methodology, applications, and limitations with a focus on its role in pediatric drug development. *J Biomed Biotechnol* **2011**:907461.
- Khalil F and Laer S (2014) Physiologically based pharmacokinetic models in the prediction of oral drug exposure over the entire pediatric age range-sotalol as a model drug. *The AAPS journal* **16**:226-239.
- Khan DD, Friberg LE and Nielsen EI (2016) A pharmacokinetic–pharmacodynamic (PKPD) model based on in vitro time–kill data predicts the in vivo PK/PD index of colistin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **71**:1881-1884.
- Kluytmans J (2017) Plasmid-encoded colistin resistance: mcr-one, two, three and counting. *Eurosurveillance* **22**.
- Knibbe CAJ and Danhof M (2011) Individualized dosing regimens in children based on population PKPD modelling: Are we ready for it? *International Journal of Pharmaceutics* **415**:9-14.
- Kuo S-C, Huang W-C, Wang H-Y, Shiau Y-R, Cheng M-F and Lauderdale T-L (2016) Colistin resistance gene mcr-1 in *Escherichia coli* isolates from humans and retail meats, Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*:dkw122.
- Kusumoto M, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T and Akiba M (2016) Colistin-resistant mcr-1–positive pathogenic *Escherichia coli* in swine, Japan, 2007– 2014. *Emerging infectious diseases* **22**:1315.
- Landersdorfer CB, Nguyen T-H, Lieu LT, Nguyen G, Bischof RJ, Meeusen EN, Li J, Nation RL and McIntosh MP (2017) Substantial Targeting Advantage Achieved by Pulmonary Administration of Colistin Methanesulfonate in a Large-Animal Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **61**:e01934-01916.
- Landman D, Georgescu C, Martin DA and Quale J (2008) Polymyxins revisited. *Clinical microbiology reviews* **21**:449-465.
- Le Devendec L, Mourand G, Bougeard S, Leaustic J, Jouy E, Keita A, Couet W, Rousset N and Kempf I (2016) Impact of colistin sulfate treatment of broilers on the presence of resistant bacteria and resistance genes in stored or composted manure. *Vet Microbiol* **194**:98-106.
- Leangapichart T, Gautret P, Brouqui P, Mimish Z, Raoult D and Rolain J-M (2016) Acquisition of mcr-1 Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during Hajj 2013 and 2014. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**:6998-6999.
- Leavens T, Tell L, Clothier K, Griffith R, Baynes RE and Riviere J (2012) Development of a physiologically based pharmacokinetic model to predict tulathromycin distribution in goats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **35**:121-131.

- Leavens TL, Tell LA, Kissell LW, Smith GW, Smith DJ, Wagner SA, Shelver WL, Wu H, Baynes RE and Riviere JE (2014) Development of a physiologically based pharmacokinetic model for flunixin in cattle (*Bos taurus*). *Food Additives & Contaminants: Part A* **31**:1506-1521.
- Lee J-Y, Choi M-J, Choi HJ and Ko KS (2015a) Preservation of acquired colistin resistance in gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Lee Y-J, Wi YM, Kwon YJ, Kim SR, Chang S-H and Cho S (2015b) Association Between Colistin Dose and Development of Nephrotoxicity. *Critical care medicine*.
- Lei L, Wang Y, Schwarz S, Walsh TR, Ou Y, Wu Y, Li M and Shen Z (2017) *mcr-1* in Enterobacteriaceae from Companion Animals, Beijing, China, 2012–2016. *Emerging Infectious Diseases* **23**:710.
- Lerman J, Strong HA, LeDez KM, Swartz J, Rieder MJ and Burrows FA (1989) Effects of age on the serum concentration of α 1-acid glycoprotein and the binding of lidocaine in pediatric patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **46**:219-225.
- Lester CH, Frimodt-Møller N, Sørensen TL, Monnet DL and Hammerum AM (2006) In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**:596-599.
- Li J, Coulthard K, Milne R, Nation RL, Conway S, Peckham D, Etherington C and Turnidge J (2003a) Steady-state pharmacokinetics of intravenous colistin methanesulphonate in patients with cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**:987-992.
- Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD and Coulthard K (2003b) Stability of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Aqueous Media and Plasma as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**:1364-1370.
- Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K and Johnson DW (2001a) A simple method for the assay of colistin in human plasma, using pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate in solid-phase extraction cartridges and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **761**:167-175.
- Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K and Valentine J (2002) Simple Method for Assaying Colistin Methanesulfonate in Plasma and Urine Using High-Performance Liquid Chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**:3304-3307.
- Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC and Coulthard K (2003c) Use of high-performance liquid chromatography to study the pharmacokinetics of colistin sulfate in rats following intravenous administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**:1766-1770.
- Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC and Coulthard K (2004) Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **53**:837-840.
- Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD and Coulthard K (2005a) Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* **25**:11-25.
- Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR and Paterson DL (2006) Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases* **6**:589-601.
- Li J, Rayner CR, Nation RL, Deans R, Boots R, Widdecombe N, Douglas A and Lipman J (2005b) Pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and colistin in a critically ill patient receiving continuous venovenous hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4814-4815.
- Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL and Coulthard K (2001b) In Vitro Pharmacodynamic Properties of Colistin and Colistin Methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **45**:781-785.

- Li M, Gehring R, Riviere JE and Lin Z (2017) Development and application of a population physiologically based pharmacokinetic model for penicillin G in swine and cattle for food safety assessment. *Food and Chemical Toxicology* **107**:74-87.
- Liakopoulos A, Mevius DJ, Olsen B and Bonnedahl J (2016) The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **71**:2335-2336.
- Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, Forrest A, Bulitta JB and Tsuji BT (2010) Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics, and dosing. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **30**:1279-1291.
- Lin Y-W, Zhou QT, Cheah S-E, Zhao J, Chen K, Wang J, Chan H-K and Li J (2017) Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Pulmonary Delivery of Colistin against *Pseudomonas aeruginosa* in a Mouse Lung Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**.
- Lin Z, Gehring R, Mochel J, Lavé T and Riviere J (2016) Mathematical modeling and simulation in animal health—Part II: principles, methods, applications, and value of physiologically based pharmacokinetic modeling in veterinary medicine and food safety assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*.
- Litrup E, Kiil K, Hammerum AM, Roer L, Nielsen EM and Torpdahl M (2017) Plasmid-borne colistin resistance gene *mcr-3* in *Salmonella* isolates from human infections, Denmark, 2009–17. *Eurosurveillance* **22**.
- Liu X, Smith BJ, Chen C, Callegari E, Becker SL, Chen X, Cianfroga J, Doran AC, Doran SD and Gibbs JP (2005) Use of a physiologically based pharmacokinetic model to study the time to reach brain equilibrium: an experimental analysis of the role of blood-brain barrier permeability, plasma protein binding, and brain tissue binding. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **313**:1254-1262.
- Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B and Huang X (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases* **16**:161-168.
- Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L-F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J-H and Shen J (2015) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Lødrup AB, Karstoft K, Dissing TH, Nyengaard JR and Pedersen M (2008) The association between renal function and structural parameters: a pig study. *BMC Nephrology* **9**:18-18.
- Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai B, Cole JR, Hashsham SA, Tiedje JM and Stanton TB (2012) In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:1691-1696.
- Lu Q, Girardi C, Zhang M, Bouhemad B, Louchahi K, Petitjean O, Wallet F, Becquemin M-H, Le Naour G and Marquette C-H (2010) Nebulized and intravenous colistin in experimental pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive care medicine* **36**:1147-1155.
- Lu Q, Luo R, Bodin L, Yang J, Zahr N, Aubry A, Golmard J-L, Rouby J-J and Group NAS (2013) Efficacy of high-dose nebulized colistin in ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Survey of Anesthesiology* **57**:222-223.
- Lu X, Chan T, Xu C, Zhu L, Zhou QT, Roberts KD, Chan H-K, Li J and Zhou F (2015) Human oligopeptide transporter 2 (PEPT2) mediates cellular uptake of polymyxins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Ma Z, Wang J, Nation RL, Li J, Turnidge JD, Coulthard K and Milne RW (2009) Renal disposition of colistin in the isolated perfused rat kidney. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**:2857-2864.

- Macfarlane EL, Kwasnicka A and Hancock RE (2000) Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* **146**:2543-2554.
- Macfarlane EL, Kwasnicka A, Ochs MM and Hancock RE (1999) PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Molecular microbiology* **34**:305-316.
- Maharaj A and Edginton A (2014) Physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation in pediatric drug development. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology* **3**:1-13.
- Mahmood I (2010) Theoretical versus empirical allometry: Facts behind theories and application to pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **99**:2927-2933.
- Mahmood I (2011) Evaluation of a morphine maturation model for the prediction of morphine clearance in children: how accurate is the predictive performance of the model? *British journal of clinical pharmacology* **71**:88-94.
- Mahmood I (2014) Dosing in children: a critical review of the pharmacokinetic allometric scaling and modelling approaches in paediatric drug development and clinical settings. *Clinical pharmacokinetics* **53**:327-346.
- Mahmood I, Ahmad T, Mansoor N and Sharib S (2017) Prediction of Clearance in Neonates and Infants (≤ 3 Months of Age) for Drugs That Are Glucuronidated: A Comparative Study Between Allometric Scaling and Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *The Journal of Clinical Pharmacology* **57**:476-483.
- Mahmood I, Staschen CM and Goteti K (2014) Prediction of drug clearance in children: an evaluation of the predictive performance of several models. *The AAPS journal* **16**:1334-1343.
- Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Butaye P and Goossens H (2016) Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid. *The Lancet infectious diseases* **16**:283-284.
- Mansoor N, Ahmad T, Alam KR, Sharib SM and Mahmood I (2016) Prediction of Clearance and Dose of Midazolam in Preterm and Term Neonates: A Comparative Study Between Allometric Scaling and Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *American journal of therapeutics*.
- Marchand S, Bouchene S, de Monte M, Guilleminault L, Montharu J, Cabrera M, Grégoire N, Gobin P, Diot P and Couet W (2015) Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate (CMS) and colistin after CMS nebulisation in baboon monkeys. *Pharmaceutical research* **32**:3403-3414.
- Marchand S, Gobin P, Brillault J, Baptista S, Adier C, Olivier JC, Mimoz O and Couet W (2010a) Aerosol therapy with colistin methanesulfonate: a biopharmaceutical issue illustrated in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54**:3702-3707.
- Marchand S, Lamarche I, Gobin P and Couet W (2010b) Dose-ranging pharmacokinetics of colistin methanesulphonate (CMS) and colistin in rats following single intravenous CMS doses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**:1753-1758.
- Markantonis S, Markou N, Fousteri M, Sakellaridis N, Karatzas S, Alamanos I, Dimopoulou E and Baltopoulos G (2009) Penetration of colistin into cerebrospinal fluid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **53**:4907-4910.
- Martis N, Leroy S and Blanc V (2014) Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. *Journal of Infection* **69**:1-12.
- McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R, Hinkle M, Whitman T, Lesho E and Schaecher KE (2016) *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a novel IncF plasmid: first report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**:4420-4421.

- McPhee JB, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS and Hancock RE (2006) Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component regulatory systems to Mg²⁺-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **188**:3995-4006.
- Meletis G, Tzampaz E, Sianou E, Tzavaras I and Sofianou D (2011) Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66**:946-947.
- Mesini A, Loy A, Gattorno M, Moscatelli A, Bandettini R, Faraci M, Cangemi G and Castagnola E (2017) Colistin Area Under the Time–Concentration in Children Treated With Intravenous Loading Dose and Maintenance Therapy. *Clinical Infectious Diseases*.
- Mohamed AF, Karaikos I, Plachouras D, Karvanen M, Pontikis K, Jansson B, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Giamarellou H, Armaganidis A, Cars O and Friberg LE (2012) Application of a Loading Dose of Colistin Methanesulfonate in Critically Ill Patients: Population Pharmacokinetics, Protein Binding, and Prediction of Bacterial Kill. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**:4241-4249.
- Mohsin M, Raza S, Roschanski N, Schaufler K and Guenther S (2016) First description of plasmid-mediated colistin-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a wild migratory bird from Asia. *International Journal of Antimicrobial Agents* **48**:463-464.
- Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, Selgrade SE, Miller SI, Denton M, Conway SP, Johansen HK and Høiby N (2012) PmrB Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**:1019-1030.
- Moskowitz SM, Ernst RK and Miller SI (2004) PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *Journal of bacteriology* **186**:575-579.
- Nakwan N, Usaha S, Chokephaibulkit K, Villani P, Regazzi M and Imberti R (2016) Pharmacokinetics of Colistin Following a Single Dose of Intravenous Colistimethate Sodium in Critically Ill Neonates. *The Pediatric infectious disease journal* **35**:1211-1214.
- Nation RL, Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Paterson DL, Turnidge JD, Forrest A and Silveira FP (2015) Updated US and European dose recommendations for intravenous colistin: how do they perform? *Clinical Infectious Diseases* **62**:552-558.
- Nation RL, Garonzik SM, Thamlikitkul V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Forrest A, Paterson DL, Li J and Silveira FP (2016) Dosing guidance for intravenous colistin in critically-ill patients. *Clinical Infectious Diseases*:ciw839.
- Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, Mouton JW, Paterson DL, Tam VH, Theuretzbacher U, Tsuji BT and Turnidge JD (2014a) Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *The Lancet Infectious Diseases*.
- Nation RL, Velkov T and Li J (2014b) Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clinical Infectious Diseases*:ciu213.
- Nestorov I (2007) Whole-body physiologically based pharmacokinetic models. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **3**:235-249.
- Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, Nguyen TV, Nguyen MT, Thai HQ, Ho MH, Thwaites G, Ngo HT and Baker S (2016) Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. *Applied and environmental microbiology* **82**:3727-3735.
- Nordmann P, Jayol A and Poirel L (2016) A universal culture medium for screening polymyxin-resistant gram negatives. *J Clin Microbiol*.

- Nordmann P and Poirel L (2016) Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **22**:398-400.
- Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, Morand S and Rolain J-M (2016) Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases* **16**:147.
- Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S and Paboriboune P (2014a) Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *International journal of antimicrobial agents* **44**:500-507.
- Olaitan AO, Morand S and Rolain JM (2014b) Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology* **5**:643.
- Olaitan AO, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Khounsy S, Morand S and Rolain J-M (2015) Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Oostdijk EA, de Smet AMG, Blok HE, Thieme Groen ES, van Asselt GJ, Benus RF, Bernards SA, Frénay IH, Jansz AR and de Jongh BM (2010) Ecological effects of selective decontamination on resistant gram-negative bacterial colonization. *American journal of respiratory and critical care medicine* **181**:452-457.
- Oostdijk EA, de Smet AMG, Kesecioglu J and Bonten MJ (2012) Decontamination of cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae during selective digestive tract decontamination in intensive care units. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**:2250-2253.
- Oostdijk EA, Smits L, de Smet AMG, Leverstein-van Hall MA, Kesecioglu J and Bonten MJ (2013) Colistin resistance in gram-negative bacteria during prophylactic topical colistin use in intensive care units. *Intensive care medicine* **39**:653-660.
- Ordooei Javan A, Shokouhi S and Sahraei Z (2015) A review on colistin nephrotoxicity. *European journal of clinical pharmacology*.
- Ovejero C, Delgado-Blas J, Calero-Caceres W, Muniesa M and Gonzalez-Zorn B (2017) Spread of mcr-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*:dkw533.
- Ozkaya-Parlakay A, Kara A and Cengiz AB (2015) Increased risk of nephrotoxicity: Side effect of colistin use in paediatric patients. *Int J Antimicrob Agents* **45**:327.
- Ozsüreki Y, Aykac K, Cengiz AB, Bayhan C, Sancak B, Oncel EK, Kara A and Ceyhan M (2016) Is colistin effective in the treatment of infections caused by multidrug-resistant (MDR) or extremely drug-resistant (XDR) gram-negative microorganisms in children? *Diagnostic microbiology and infectious disease* **85**:233-238.
- Paksu MS, Paksu S, Karadag A, Sensoy G, Asilioglu N, Yildizdas D, Akyildiz BN, Kendirli T, Demirkol D and Akgun M (2012) Old agent, new experience: colistin use in the paediatric intensive care unit—a multicentre study. *International journal of antimicrobial agents* **40**:140-144.
- Parrott N, Davies B, Hoffmann G, Koerner A, Lave T, Prinssen E, Theogaraj E and Singer T (2011) Development of a Physiologically Based Model for Oseltamivir and Simulation of Pharmacokinetics in Neonates and Infants. *Clinical pharmacokinetics* **50**:613-623.
- Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, Soumet C and Sanders P (2016) Prevalence of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **21**.
- Peters SA (2012) Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulations: principles, methods, and applications in the pharmaceutical industry, John Wiley & Sons.

- Peterson A, Hancock R and McGroarty E (1985) Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **164**:1256-1261.
- Petrosillo N, Giannella M, Lewis R and Viale P (2013) Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art.
- Peyret T, Poulin P and Krishnan K (2010) A unified algorithm for predicting partition coefficients for PBPK modeling of drugs and environmental chemicals. *Toxicology and applied pharmacology* **249**:197-207.
- Phe K, Johnson ML, Palmer HR and Tam VH (2014) Validation of a model to predict the risk of nephrotoxicity in patients receiving colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**:6946-6948.
- Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, Karaikos I, Poulakou G, Kontopidou F, Armaganidis A, Cars O and Giamarellou H (2009) Population Pharmacokinetic Analysis of Colistin Methanesulfonate and Colistin after Intravenous Administration in Critically Ill Patients with Infections Caused by Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**:3430-3436.
- Pogue JM, Martin ET, Kaye KS, Marchaim D and Hayakawa K (2015) Discordance in reported rates of nephrotoxicity associated with colistin: a systematic review to analyze the role of dose and definition, in 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Basel, Switzerland.
- Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D and Nordmann P (2016) Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *The Lancet Infectious diseases* **16**:00006-00002.
- Pournaras S, Poulou A, Dafopoulou K, Chabane YN, Kristo I, Makris D, Hardouin J, Cosette P, Tsakris A and Dé E (2014) Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**:828-832.
- Pulss S, Semmler T, Prenger-Berninghoff E, Bauerfeind R and Ewers C (2017) First report of an *E. coli* strain from swine carrying an OXA-181-carbapenemase and colistin resistance determinant MCR-1. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, Campos MJ, García M, Píriz S, Sáez JL and Domínguez L (2016) Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. *Research in Veterinary Science* **105**:134-135.
- Quini CC, Américo MF, Corá LA, Calabresi MF, Alvarez M, Oliveira RB and Miranda JA (2012) Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats. *Journal of biological engineering* **6**:6.
- Radke C, Horn D, Lanckohr C, Ellger B, Meyer M, Eissing T and Hempel G (2017) Development of a Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling Approach to Predict the Pharmacokinetics of Vancomycin in Critically Ill Septic Patients. *Clinical pharmacokinetics* **56**:759-779.
- Rawson TM, Moore LS, Hatcher JC, Donaldson H and Holmes AH (2016) Plasmid-mediated colistin resistance mechanisms: is it time to revise our approach to selective digestive decontamination? *The Lancet Infectious diseases* **16**:149-150.
- Renard L, Sanders P and Laurentie M (1991) Pharmacocinétique de la colistine sulfate administrée par voies intraveineuse et intramusculaire chez le veau, in *Annales de Recherches Vétérinaires* pp 387-394.
- Rhouma M, Beaudry F and Letellier A (2016a) Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *International journal of antimicrobial agents* **48**:119-126.
- Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Bergeron N, Beauchamp G, Laurent-Lewandowski S, Fairbrother JM and Letellier A (2016b) In vivo therapeutic efficacy and pharmacokinetics of colistin sulfate

- in an experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *Veterinary Research* **47**:58.
- Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Bergeron N, Laurent-Lewandowski S, Fairbrother JM and Letellier A (2015) Gastric stability and oral bioavailability of colistin sulfate in pigs challenged or not with *Escherichia coli* O149: F4 (K88). *Research in Veterinary Science* **102**:173-181.
- Rhouma M, Beaudry F, Thériault W and Letellier A (2016c) Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Frontiers in microbiology* **7**.
- Rhouma M and Letellier A (2017) Extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases and the mcr-1 gene: is there an historical link?, Elsevier.
- Richez P and Burch DG (2016) Colistin in animals: a high risk for resistance selection in Europe? *Veterinary Record* **178**:101-102.
- Roer L, Hansen F, Stegger M, Sönksen UW, Hasman H and Hammerum AM (2017) Novel mcr-3 variant, encoding mobile colistin resistance, in an ST131 *Escherichia coli* isolate from bloodstream infection, Denmark, 2014. *Eurosurveillance* **22**.
- Roschanski N, Falgenhauer L, Grobbel M, Guenther S, Kreienbrock L, Imirzalioglu C and Roesler U (2017) Retrospective survey of mcr-1 and mcr-2 in German pig-fattening farms, 2011-2012. *Int J Antimicrob Agents*.
- Rostami-Hodjegan A (2012) Physiologically based pharmacokinetics joined with in vitro–in vivo extrapolation of ADME: a marriage under the arch of systems pharmacology. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **92**:50-61.
- Rottbøll LAH and Friis C (2016) Penetration of antimicrobials to pulmonary epithelial lining fluid and muscle and impact of drug physicochemical properties determined by microdialysis. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **78**:58-65.
- Rowland IR, Mallett AK and Wise A (1985) The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. *CRC Critical Reviews in Toxicology* **16**:31-103.
- Ruark CD, Hack CE, Robinson PJ, Mahle DA and Gearhart JM (2014) Predicting Passive and Active Tissue:Plasma Partition Coefficients: Interindividual and Interspecies Variability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **103**:2189-2198.
- Ruzauskas M and Vaskeviciute L (2016) Detection of the mcr-1 gene in *Escherichia coli* prevalent in the migratory bird species *Larus argentatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **71**:2333-2334.
- Sadiq MW, Nielsen EI, Khachman D, Conil J-M, Georges B, Houin G, Laffont CM, Karlsson MO and Friberg LE (2016) A whole-body physiologically based pharmacokinetic (WB-PBPK) model of ciprofloxacin: a step towards predicting bacterial killing at sites of infection. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*:1-11.
- Salminen S, Isolauri E and Onnela T (1995) Gut flora in normal and disordered states. *Chemotherapy* **41**:5-15.
- Sampson TR, Liu X, Schroeder MR, Kraft CS, Burd EM and Weiss DS (2012) Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **56**:5642-5649.
- Sarginson RE, Petros AJ, Taylor N, Fox MA, Weir I, Silvestri L, van Saene HK and de la Cal MA (2011) Selective decontamination of the digestive tract (SDD), a standard of care. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* **1**:452-468.
- Schmitt W (2008) General approach for the calculation of tissue to plasma partition coefficients. *Toxicology in Vitro* **22**:457-467.

- Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J and Wu C (2016) Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals. *The Lancet Infectious Diseases* **16**:293.
- Silley P (2009) Human flora-associated rodents—does the data support the assumptions? *Microbial biotechnology* **2**:6-14.
- Silvestri L, Miguel A and van Saene HK (2012) Selective decontamination of the digestive tract: the mechanism of action is control of gut overgrowth. *Intensive care medicine* **38**:1738-1750.
- Sivanesan S, Roberts K, Wang J, Chea S-E, Thompson PE, Li J, Nation RL and Velkov T (2017) Pharmacokinetics of the Individual Major Components of Polymyxin B and Colistin in Rats. *Journal of Natural Products*.
- Skov R and Monnet D (2016) Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **21**:30155.
- Son D, Osabe M, Shimoda M and Kokue E (1998) Contribution of α 1-acid glycoprotein to species difference in lincosamides-plasma protein binding kinetics. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **21**:34-40.
- Soon RL, Velkov T, Chiu F, Thompson PE, Kancharla R, Roberts K, Larson I, Nation RL and Li J (2011) Design, synthesis, and evaluation of a new fluorescent probe for measuring polymyxin–lipopolysaccharide binding interactions. *Analytical biochemistry* **409**:273-283.
- Soraci AL, Amanto F, Tapia MO, de la Torre E and Toutain P-L (2014) Exposure variability of fosfomycin administered to pigs in food or water: impact of social rank. *Research in veterinary science* **96**:153-159.
- Speekenbrink A, Alcock S, Forrester J and Parrott D (1987) The effect of selective decontamination of the digestive tract with the addition of systemic cefotaxime on the aerobic faecal flora of mice. *Epidemiology and infection* **98**:385-395.
- Srinivasan VB and Rajamohan G (2013) KpnEF, a new member of the Klebsiella pneumoniae cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**:4449-4462.
- Sun J, Xu Y, Gao R, Lin J, Wei W, Srinivas S, Li D, Yang R-S, Li X-P and Liao X-P (2017) Deciphering MCR-2 Colistin Resistance. *mBio* **8**:e00625-00617.
- Suzuki S, Ohnishi M, Kawanishi M, Akiba M and Kuroda M (2016) Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene mcr-1. *The Lancet infectious diseases* **16**:284-285.
- Suzuki T, Inouye H, Fujikawa K and Suketa Y (1963) STUDIES ON THE CHEMICAL STRUCTURE OF COLISTIN. I. FRACTIONATION, MOLECULAR WEIGHT DETERMINATION, AMINO ACID AND FATTY ACID COMPOSITION. *Journal of biochemistry* **54**:25-33.
- Suzuki T, Yamaguchi H, Ogura J, Kobayashi M, Yamada T and Iseki K (2013) Megalin contributes to kidney accumulation and nephrotoxicity of colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**:6319-6324.
- Sweeney LM, Kirman CR, Gannon SA, Thrall KD, Gargas ML and Kinzell JH (2009) Development of a physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for methyl iodide in rats, rabbits, and humans. *Inhalation toxicology* **21**:552-582.
- Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ and Frazier KS (2012) Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Veterinary Pathology Online* **49**:344-356.
- Tamma PD, Newland JG, Pannaraj PS, Metjian TA, Banerjee R, Gerber JS, Weissman SJ, Beekmann SE, Polgreen PM and Hersh AL (2013) The use of intravenous colistin among children in the United States: results from a multicenter, case series. *The Pediatric infectious disease journal* **32**:17.
- Tang S, Gong L, He J, Jin X and Xiao X (2009) Residue depletion of colistin in swine after intramuscular administration. *Journal of the South African Veterinary Association* **80**:41-44.

- Tekgunduz KS, Kara M, Caner I and Demirelli Y (2015) Safety and efficacy of intravenous colistin in neonates with culture proven sepsis. *Iranian journal of pediatrics* **25**.
- Thiel C, Schneckener S, Krauss M, Ghallab A, Hofmann U, Kanacher T, Zellmer S, Gebhardt R, Hengstler JG and Kuepfer L (2015) A Systematic Evaluation of the Use of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling for Cross-Species Extrapolation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **104**:191-206.
- Timmerman T, Dewulf J, Catry B, Feyen B, Opsomer G, de Kruif A and Maes D (2006) Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Preventive veterinary medicine* **74**:251-263.
- Trung NV, Matamoros S, Carrique-Mas JJ, Nghia NH, Nhung NT, Chieu TTB, Mai HH, van Rooijen W, Campbell J and Wagenaar JA (2017) Zoonotic Transmission of mcr-1 Colistin Resistance Gene from Small-Scale Poultry Farms, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases* **23**:529.
- Tsamandouras N (2015) Development and applications of physiologically-based pharmacokinetic models for population data analyses, University of Manchester.
- Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F and Cristini F (2012) Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical Infectious Diseases* **55**:943-950.
- van der Meer JW and Vandenbroucke-Grauls CM (2013) Resistance to selective decontamination: the jury is still out. *The Lancet Infectious Diseases* **13**:282-283.
- van der Voort PH and van Saene HK (2008) Selective Digestive Tract Decontamination in Intensive Care Medicine.
- Van Peer E, Downes N, Casteleyn C, Van Ginneken C, Weeren A and Van Cruchten S (2015) Organ data from the developing Gottingen minipig: first steps towards a juvenile PBPK model. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*.
- Van Saene JJ, Van Saene HK, Stoutenbeek CP and Lerk CF (1985) Influence of faeces on the activity of antimicrobial agents used for decontamination of the alimentary canal. *Scandinavian journal of infectious diseases* **17**:295-300.
- Vardakas KZ and Falagas ME (2016) Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Vardakas KZ, Voulgaris GL, Samonis G and Falagas ME (2017) Inhaled colistin monotherapy for respiratory tract infections in adults without cystic fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE and Li J (2013) Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future microbiology* **8**:10.2217/fmb.2213.2239.
- Velkov T, Thompson PE, Nation RL and Li J (2009) Structure– activity relationships of polymyxin antibiotics. *Journal of medicinal chemistry* **53**:1898-1916.
- Vinks AA, Emoto C and Fukuda T (2015) Modeling and simulation in pediatric drug therapy: Application of pharmacometrics to define the right dose for children. *Clin Pharmacol Ther* **98**:298-308.
- Visentin M, Gai Z, Torozi A, Hiller C and Kullak-Ublick GA (2017) Colistin is substrate of the carnitine/organic cation transporter 2 (OCTN2, SLC22A5). *Drug Metabolism and Disposition:dmd*. 117.077248.
- Walsh TR and Wu Y (2016) China bans colistin as a feed additive for animals. *The Lancet Infectious Diseases* **16**:1102-1103.
- Wang X, Liu Y, Qi X, Wang R, Jin L, Zhao M, Zhang Y, Wang Q, Chen H and Wang H (2017a) Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatients and avian from

- China: high prevalence of mcr-negative *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Wang Y, Tian G-B, Zhang R, Shen Y, Tyrrell JM, Huang X, Zhou H, Lei L, Li H-Y, Doi Y, Fang Y, Ren H, Zhong L-L, Shen Z, Zeng K-J, Wang S, Liu J-H, Wu C, Walsh TR and Shen J (2017b) Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious Diseases* **17**:390-399.
- Watanabe T, Kusuvara H, Maeda K, Shitara Y and Sugiyama Y (2009) Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **328**:652-662.
- Weber EJ, Chapron A, Chapron BD, Voellinger JL, Lidberg KA, Yeung CK, Wang Z, Yamaura Y, Hailey DW and Neumann T (2016) Development of a microphysiological model of human kidney proximal tubule function. *Kidney international* **90**:627-637.
- Weill F-X, Lailier R, Praud K, K  rouanton A, Fabre L, Brisabois A, Grimont PA and Cloeckert A (2004) Emergence of extended-spectrum-  -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *Journal of clinical microbiology* **42**:5767-5773.
- West GB, Brown JH and Enquist BJ (1997) A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science* **276**:122-126.
- White CR, Cassey P and Blackburn TM (2007) Allometric exponents do not support a universal metabolic allometry. *Ecology* **88**:315-323.
- White CR and Seymour RS (2003) Mammalian basal metabolic rate is proportional to body mass^{2/3}. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**:4046-4049.
- Willmann S, H  hn K, Edginton A, Sevestre M, Solodenko J, Weiss W, Lippert J and Schmitt W (2007) Development of a physiology-based whole-body population model for assessing the influence of individual variability on the pharmacokinetics of drugs. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* **34**:401-431.
- Wittekamp BH, Oostdijk EA, de Smet AM and Bonten MJ (2015) Colistin and tobramycin resistance during long- term use of selective decontamination strategies in the intensive care unit: a post hoc analysis. *Critical care (London, England)* **19**:113.
- Wong H and Chow TW (2017) Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Therapeutic Proteins. *Journal of pharmaceutical sciences*.
- Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, Kaye K, Jacobs MR, Bonomo RA and Adams MD (2015) Genomic and Transcriptomic Analyses of Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Reveal Multiple Pathways of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**:536-543.
- Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H and Malhotra-Kumar S (2016) Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* **21**.
- Yang F, Liu HW, Li M, Ding HZ, Huang XH and Zeng ZL (2011) Use of a Monte Carlo analysis within a physiologically based pharmacokinetic model to predict doxycycline residue withdrawal time in edible tissues in swine. *Food Additives & Contaminants: Part A* **29**:73-84.
- Yang X, Morris SM, Gearhart JM, Ruark CD, Paule MG, Slikker Jr W, Mattison DR, Vitiello B, Twaddle NC and Doerge DR (2014) Development of a physiologically based model to describe the pharmacokinetics of methylphenidate in juvenile and adult humans and nonhuman primates. *PloS one* **9**:e106101.
- Yang Y-Q, Li Y-X, Song T, Yang Y-X, Jiang W, Zhang A-Y, Guo X-Y, Liu B-H, Wang Y-X, Lei C-W, Xiang R and Wang H-N (2017) Colistin Resistance Gene mcr-1 and Its Variant in *Escherichia coli* Isolates from Chickens in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**.

- Yates JW (2006) Structural identifiability of physiologically based pharmacokinetic models. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* **33**:421-439.
- Yi P and Li L (2012) The germfree murine animal: an important animal model for research on the relationship between gut microbiota and the host. *Veterinary microbiology* **157**:1-7.
- Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J and Wang Y (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio* **8**:e00543-00517.
- Yoon E, McGann P, Lesho E, Waterman P, Clifford R, Courvalin P and Grillot-Courvalin C (2013) Biological cost of colistin-resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, in 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany.
- Yousef JM, Chen G, Hill PA, Nation RL and Li J (2011) Melatonin attenuates colistin-induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**:4044-4049.
- Yun B, Azad MA, Nowell CJ, Nation RL, Thompson PE, Roberts KD, Velkov T and Li J (2015) Cellular uptake and localization of polymyxins in renal tubular cells using rationally designed fluorescent probes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**:7489-7496.
- Yun B, Azad MA, Wang J, Nation RL, Thompson PE, Roberts KD, Velkov T and Li J (2014) Imaging the distribution of polymyxins in the kidney. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*:dku441.
- Zandstra D, Abecasis F, Taylor N, Damjanovic V, Silvestri L and van Saene H (2013) For control of colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria, SDD does work. *Intensive care medicine* **39**:539-539.
- Zandstra D, Rommes J, de la Cal M, Silvestri L, Taylor N and van Saene H (2014) Colistin resistance during selective digestive tract decontamination is uncommon. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**:626-626.
- Zavascki AP and Nation RL (2016) Nephrotoxicity of polymyxins: Is there any difference between colistimethate and polymyxin B? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Zhang P, Shen Z, Zhang C, Song L, Wang B, Shang J, Yue X, Qu Z, Li X and Wu L (2017) Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine, China, 2008–2015. *Veterinary Microbiology* **203**:49-55.
- Zhang R, Huang Y, Chan EW-c, Zhou H and Chen S (2016a) Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases* **16**:291-292.
- Zhang X-F, Doi Y, Huang X, Li H-Y, Zhong L-L, Zeng K-J, Zhang Y-F, Patil S and Tian G-B (2016b) Possible transmission of *mcr-1*–harboring *Escherichia coli* between companion animals and human. *Emerging infectious diseases* **22**:1679.
- Zurfluh K, Stephan R, Widmer A, Poirel L, Nordmann P, Nüesch H-J, Hächler H and Nüesch-Inderbilen M (2017) Screening for fecal carriage of MCR-producing Enterobacteriaceae in healthy humans and primary care patients. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **6**:28.
- Zurfluh K, Poirel L, Nordmann P, Nüesch-Inderbilen M, Hächler H and Stephan R (2016) Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in river water and imported vegetable samples in Switzerland. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **60**:2594-2595.

Usages de la colistine en médecine humaine et vétérinaire : exploration pharmacocinétique et problématique d'antibiorésistance.

RESUME :

La colistine est un vieil antibiotique, utilisé à la fois en médecine humaine et vétérinaire. Cependant, l'arsenal antibiotique étant de plus en plus limité, la colistine apparaît comme un des derniers remparts dans la lutte contre les bactéries multi-résistantes chez l'Homme. Afin de préserver l'efficacité de la colistine, deux problématiques ont été abordées dans cette thèse :

- (i) les risques de sélection de résistance à la colistine en lien avec la découverte fin 2015 d'un gène porté par un plasmide (*mcr-1*). Ainsi, l'impact de l'usage de colistine par voie orale en production porcine a été évalué *in vivo* et une absence de sélection a été observée dans nos conditions expérimentales. De façon similaire, l'usage (minoritaire) de colistine en médecine humaine comme prophylaxie de décontamination digestive sélective (SDD) a été étudié chez des rats hébergeant un microbiote intestinal humain. Les résultats préliminaires ne montrent pas non plus d'effet de sélection.
- (ii) le développement d'un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie (PBPK) chez le porc pour l'usage par voie systémique de la colistine et de sa prodrogue, le colistine méthanesulfonate (CMS). Ce modèle a permis d'explorer la distribution tissulaire du CMS et de la colistine, notamment au niveau rénal où la toxicité est la plus fréquente. Comme application de ce modèle, l'estimation des temps d'attente avant abattage lors d'usage de CMS chez le porc a été effectuée. Enfin, la capacité des modèles PBPK à réaliser des extrapolations intra et inter-espèces a été utilisée pour adapter ce modèle chez l'adulte et l'enfant, afin de pouvoir prédire les concentrations plasmatiques de colistine lors d'un traitement.

Mots-clés : colistine, antibiorésistance, pharmacocinétique, modèle animal, gène *mcr-1*, modèle PBPK, médecine humaine, médecine vétérinaire