

Thèse de Doctorat

Guillaume LHERMIE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

grade de Docteur d'Oniris - l'École Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique

sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : *Biologie-Santé Nantes-Angers*

Discipline : *Biologie, Médecine, Santé*

Spécialité : *Recherche clinique, innovation technologique, santé publique*

Unité de recherche : *UMR Oniris INRA 1300 Biologie, Epidémiologie et Analyse de Risque en santé animale (BioEpAR)*

Soutenue le *22 octobre 2015*

Traitement précoce des bronchopneumonies infectieuses bovines avec une dose réduite de marbofloxacin

JURY

Rapporteurs :	Céline PULCINI , Professeur, Université de Lorraine Jean-Yves MADEC , Directeur de Recherches, Anses, Lyon
Examineurs :	Claire CHAUVIN , Directeur de Projets de Recherches, Anses, Ploufragan Sébastien ASSIE , Maître de Conférences, Oniris, Nantes Gilles MEYER , Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Directeur de Thèse :	Henri SEEGERs , Directeur de Recherches, INRA Nantes-Angers
Co-directeur de Thèse :	Alain BOUSQUET-MELOU , Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Sommaire

1. CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE.....	8
2. CHAPITRE 2. FACTEURS DETERMINANTS ET LEVIERS DE REDUCTION DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES EN PRODUCTIONS ANIMALES	39
3. CHAPITRE 3. DIFFERENCE D'ACTIVITE IN VITRO ET IN VIVO D'UNE FLUOROQUINOLONE SUR DEUX ESPECES BACTERIENNES DE LA FAMILLE DES <i>PASTEURELLACEAE</i> DE CMI SIMILAIRES. CONSÉQUENCES SUR LES DOSES EFFICACES	68
4. CHAPITRE 4. IMPACT DE LA DOSE ET DE LA PRECOCITE D'UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE AVEC UNE FLUOROQUINOLONE SUR LES GUERISONS BACTERIOLOGIQUE ET CLINIQUE ET L'EXTENSION DES LESIONS PULMONAIRES APRES INFECTION EXPERIMENTALE A <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> CHEZ LE VEAU	89
5. CHAPITRE 5. NOUVELLES PERSPECTIVES DE TRAITEMENT DES MALADIES RESPIRATOIRES BOVINES : EVALUATION TERRAIN DE LA CONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES ET DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE D'UN PROTOCOLE DE TRAITEMENT AJUSTE	115
6. CHAPITRE 6. EVALUATION DE L'IMPACT DE DEUX DOSES DE FLUOROQUINOLONE SUR LA SELECTION DE BACTERIES RESISTANTES DANS LA FLORE INTESTINALE COMMENSALE DU VEAU ET DU JEUNE BOVIN.....	140
7. CHAPITRE 7. DISCUSSION GENERALE.....	161
Liste des publications et communications.....	183
Table des figures.....	186
Table des tableaux.....	189
Table des matières.....	190

Préambule : cadre des travaux

Les travaux présentés dans cette thèse sont développés dans le cadre d'un partenariat public-privé entre le laboratoire Vetoquinol et plusieurs unités mixtes de recherche de l'INRA :

- l'UMR Oniris-INRA 1300 « Biologie Epidémiologie et Analyse Risque en santé animale » (BioEpAR),
- l'UMR ENVT-INRA 1331 Toxalim,
- l'UMR ENVT-INRA 1225 « Interactions Hôtes-Agents Pathogènes » (IHAP),
- ainsi que l'UMR 1302 INRA-Agrocampus Ouest « Structures et Marchés Agricoles, Ressources et Territoires » (SMART).

Une partie des travaux de recherche a été réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse au sein de l'UMR Toxalim sous la supervision de M. Alain Bousquet-Mélou, Professeur à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, et au sein de l'UMR IHAP sous la supervision de M. Gilles Meyer, Professeur à l'Ecole Vétérinaire de Toulouse.

Une autre partie des travaux a été réalisée à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris) au sein de l'UMR BioEpAR sous la supervision de M. Sébastien Assié, Maître de conférences Oniris et de M. Henri Seegers, Directeur de recherche INRA. Terrena Innovation, représenté par Mmes Cécile Guillon et Marie-Anne Le Foll, a participé à la définition de l'étude de terrain, mis à disposition une partie de son personnel et mobilisé plusieurs éleveurs adhérents du groupement de producteurs de bovins de Terrena pour le déroulement opérationnel de cette phase des travaux. Une étude bibliographique a été conduite en collaboration avec M. Stéphane Krebs, Ingénieur de recherche INRA à l'UMR BioEpAR, M. Pierre Dupraz, Directeur de recherche INRA à l'UMR SMART, et M. Didier Raboisson, Maître de conférences ENVT à l'UMR IHAP.

Les études microbiologiques ont partiellement été conduites au laboratoire de microbiologie de Vetoquinol à Lure, sous la direction de Mme Frédérique Woerhlé, Directrice du département préclinique-clinique, avec le soutien de M. Farid El Garch, Responsable du département de microbiologie, au sein de la Direction du Développement des Produits. Mme Frédérique Woerhlé, M. Farid El Garch, et M. Marc Schneider, de la Direction du Développement des Produits, dirigée par M. Didier Peoc'h, ont, de plus, participé au pilotage des travaux de recherche.

Outre la participation des acteurs mentionnés plus haut, le comité de thèse, formé dans le cadre de l'École doctorale Biologie Santé Nantes-Angers, a bénéficié du concours de Mme Claire Chauvin, Directeur de projets de recherche Anses à Unité « Épidémiologie et bien-être du porc » ainsi que de celui de M. Benoît Doublet, Chargé de recherche INRA à l'UMR 1282 INRA-Univ. Tours « Infectiologie et Santé Publique ».

Les travaux ont été financés par Vetoquinol, représenté par M. Matthieu Frechin, Directeur général, qui a également mis à disposition à temps partiel M. Guillaume Lhermie, pour la gestion du partenariat et la réalisation des travaux. Ils ont pu être réalisés grâce à la collaboration du personnel des UMR mentionnées au premier paragraphe, de l'équipe de la Direction du Développement des Produits Vetoquinol, et des éleveurs adhérents au groupement Terrena impliqués dans cette étude.

Remerciements

1. CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE

Contexte, enjeux, état des connaissances et positionnement du travail de recherche

En contribuant à la guérison des infections bactériennes des animaux ou à leur prévention, les traitements par administration d'antibiotiques répondent à des enjeux de bien-être animal, mais également de santé publique dans la lutte contre certaines maladies infectieuses contagieuses et particulièrement des zoonoses (maladies animales pouvant être transmises à l'homme) (Lhermie, 2010). En productions animales, l'éleveur utilise les antibiotiques pour réduire les dommages causés par les maladies infectieuses, dommages qui diminuent la rentabilité économique de la production. Malgré tous ces bénéfices, l'usage des antibiotiques comporte des risques. Les risques directs pour la santé des animaux, ou des consommateurs *via* l'ingestion de molécules antibiotiques, sont minimes; en effet la réglementation encadrant la mise sur le marché et le suivi des médicaments limite fortement ce type de risque par l'établissement de délais d'attente entre l'administration des médicaments chez l'animal et l'entrée des produits issus des animaux traités dans la chaîne alimentaire. Par contre, l'usage des antibiotiques entraîne une pression de sélection favorisant l'émergence de bactéries résistantes (zoonotiques ou commensales) potentiellement transmissibles à l'homme, soit par le biais d'une proximité professionnelle homme-animal, soit *via* la chaîne alimentaire (Angulo et al., 2004; Bywater, 2004). L'antibiorésistance associée à l'antibiothérapie animale constitue une externalité négative majeure sur la santé publique. L'enjeu de santé publique lié à l'antibiorésistance justifie de maîtriser l'usage des antibiotiques chez les animaux, en respectant la maxime « aussi peu que possible, autant que nécessaire » (Laxminarayan, 2014). Dans cette optique, plusieurs voies de réduction d'usage des antibiotiques peuvent être envisagées. Après avoir précisé les termes antibiotiques et antibiorésistance, ce chapitre abordera les enjeux liés à l'usage des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, et les possibles leviers de réduction d'usage. Les politiques publiques implémentées en France en 2014, envisagées comme levier de réduction d'usage, feront l'objet du dernier chapitre du travail de thèse. Les deux dernières sections de ce chapitre seront consacrées à la présentation du positionnement du travail de recherche renseignant les possibilités de réduction d'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire, dans le cadre de l'antibiothérapie des maladies respiratoires bovines.

1.1 Antibiotiques et antibiorésistance

1.1.1 Définitions

On définit sous le terme antibiotique une substance d'origine naturelle ou de synthèse ayant des propriétés antibactériennes qui, administrée à un organisme, peut bloquer la croissance d'autres microorganismes ou même les détruire sans intoxiquer l'hôte (Bentley and Bennett, 2003). La découverte des antibiotiques a constitué un tournant dans l'histoire de l'humanité, quand pour la première fois leur usage a permis de guérir de maladies jusqu'alors considérées comme incurables. Depuis la mise au point des sulfamides en 1932 par Domagk et la découverte des propriétés antibiotiques du sulfanilamide à l'Institut Pasteur en 1935, la recherche médicale a largement élargi la pharmacopée d'antibiotiques, à la faveur de découverte de nouvelles classes ou de modifications de molécules existantes.

Les antibiotiques sont répartis en plusieurs familles ou classes, dont la dernière, la classe des oxazolidinones, a été la seule découverte dans les trente dernières années (Acar and Moulin, 2012; Boucher et al., 2013). Plusieurs caractéristiques permettent de différencier l'activité des antibiotiques. Leur spectre d'activité tout d'abord : les antibiotiques peuvent avoir une activité sur les bactéries Gram+, les bactéries Gram-, large spectre (Gram+ et Gram-) ou spécifique (par exemple antifongique). Les antibiotiques se distinguent également par des modes d'action différents, concentration-dépendant ou temps-dépendant, bactéricide ou bactériostatique, et par leurs cibles. Cinq modes d'actions sont décrits (Walsh, 2003) : (i) action sur la synthèse du peptidoglycane; (ii) altération de la paroi; (iii) action sur la synthèse des protéines; (iv) action sur la synthèse des acides nucléiques; (v) action sur le métabolisme intermédiaire.

Les domaines d'utilisation des antibiotiques sont variés. Ils sont utilisés dans la lutte contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, en médecine humaine, et en sont devenus des pièces essentielles au sein des dispositifs de santé (Zarb and Goossens, 2012). Ils sont également utilisés pour le traitement des maladies infectieuses affectant les animaux de compagnie et de sport. Dans le domaine des productions animales, les antibiotiques sont utilisés soit pour guérir des maladies existantes, soit pour prévenir l'apparition de maladies infectieuses, dans des situations à risque avéré (Pagel and Gautier, 2012). Ils peuvent également être utilisés comme facteurs de croissance, même si cette utilisation est bannie dans certains pays, comme par exemple dans ceux de l'Union Européenne (EU, 2003). Enfin, certaines molécules, comme les tétracyclines et la streptomycine sont également utilisées en production végétale (Stockwell and Duffy, 2012).

Il existe une multiplicité de définitions de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Courvalin, 2008). Nous adopterons une définition microbiologique, qui décrit une résistance comme une élévation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) : une bactérie résistante va tolérer des concentrations très supérieures à celles d'une majorité de souches de la même espèce. Les espèces bactériennes qui ne sont pas incluses dans le spectre d'activité des antibiotiques sont donc par définition résistantes ; on qualifie ce type de résistance de résistance intrinsèque ou naturelle. En parallèle, des souches appartenant aux espèces bactériennes habituellement sensibles peuvent être résistantes, et sélectionnées par l'usage d'antibiotiques ou de produits chimiques sans intérêt médical. On parle alors de résistance acquise. L'aptitude des bactéries à développer des résistances provient d'une réponse adaptative de la bactérie à une pression de sélection exercée par l'antibiotique (Walsh, 2003). Les quatre mécanismes majeurs de résistance mis en place par les bactéries consistent à : (i) modifier la cible, entraînant une perte d'affinité de la molécule pour sa cible ; (ii) produire des enzymes de détoxification ; (iii) diminuer la perméabilité de la membrane bactérienne (chez les bactéries Gram-) ; (iv) rejeter la molécule en dehors de la cellule bactérienne, par des mécanismes d'efflux. Ces mécanismes concernent la quasi-totalité des antibiotiques (Walsh, 2003).

1.1.1.1 Emergence et sélection des résistances.

L'émergence de résistances est un phénomène aléatoire (Courvalin, 2005). Elle peut résulter des modifications du matériel génétique de la bactérie, soit par mutation des gènes structuraux ou des gènes de régulation, soit par acquisition de matériel génétique étranger. Elle n'a pas de lien direct avec la présence d'antibiotique.

En revanche, les antibiotiques sélectionnent les résistances par le biais de divers mécanismes (Acar and Moulin, 2012). Les antibiotiques jouent le rôle de promoteurs de transferts de gènes : ils exercent en effet une pression de sélection qui permet aux bactéries résistantes de se maintenir et par la suite de se disséminer, mais ils peuvent aussi favoriser le transfert de gènes de résistance. A faible dose, ils jouent le rôle d'agents de stress, qui peuvent induire la transformation bactérienne, comme cela a été mis en évidence avec *Streptococcus pneumoniae* en présence de mitomycine C (Prudhomme et al., 2006). Il a également été mis en évidence que l'usage de doses subinhibitrices (inférieures à la CMI) de pénicilline augmentait le transfert par conjugaison de plasmide de *Escherichia coli* vers *Staphylococcus aureus* (Trieu-Cuot et al., 1993).

1.1.2 Supports génétiques des mécanismes de résistance

La résistance bactérienne s'acquiert par modification d'un ou plusieurs gènes qui rendent la bactérie moins sensible à l'antibiotique. Le génome bactérien est composé du chromosome bactérien, et d'éléments accessoires. Les modifications peuvent affecter soit qualitativement soit quantitativement le matériel génétique. Ainsi on peut distinguer trois grands types de modifications (Walsh, 2003) : (i) des modifications qualitatives du génome bactérien par mutation chromosomique ; (ii) des modifications quantitatives du génome bactérien par transfert d'information génétique ; (iii) des modifications qualitatives et quantitatives du génome bactérien par mutation dans un gène transféré. Le chromosome bactérien est transmis verticalement de la cellule-mère aux cellules-filles, alors que les éléments génétiques mobiles peuvent être transmis verticalement et horizontalement.

Les résistances chromosomiques proviennent de mutations de gènes pré-existants codant pour les constituants physiologiques de la bactérie. Ces mutations sont généralement rares (fréquence de 10^{-6} à 10^{-9}), et apparaissent principalement dans les gènes structuraux. Les bactéries ne persistent généralement qu'en présence de celui-ci, car l'avantage compétitif en présence d'antibiotique se transforme en handicap en son absence, le métabolisme de la bactérie mutée étant moins performant (Melnik et al., 2014). Ces résistances ne concernent souvent qu'une seule classe d'antibiotique. Toutefois, il est possible que les mutations affectent des gènes de régulation, et le coût métabolique de la résistance serait alors variable à nul, qui laisse ouverte la question sur la réversibilité de la résistance (Andersson and Hughes, 2010).

Les gènes de résistance sont fréquemment portés par les éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons et intégrons). Les plasmides sont des fragments d'ADN autonomes, non indispensables à la bactérie et qui lui confèrent des avantages compétitifs. Les échanges des plasmides entre bactéries peuvent être verticaux, et horizontaux par conjugaison, par transduction et transformation. Plusieurs gènes de résistance peuvent être portés par le même élément génétique mobile. L'acquisition d'un plasmide par une bactérie n'entraîne pas de coût métabolique, ces bactéries résistantes persistent donc en l'absence d'antibiotique.

1.2 Impact de l'usage des antibiotiques en médecines humaine et vétérinaire et leviers de réduction d'usage

La résistance bactérienne est supportée par des mécanismes variables, et affecte toutes les familles de bactéries. Les bactéries multirésistantes constituent une véritable menace en médecine de ville comme en médecine hospitalière, et malgré les nombreuses familles d'antibiotiques existantes, les échecs de traitements associés aux bactéries multirésistantes représentent des coûts humains et financiers évalués à plusieurs milliers de vie et millions d'euros chaque année. Depuis 2000, aucune nouvelle famille d'antibiotique n'a été découverte ; un rapport de l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) en 2009 rapporte que seules 5 nouvelles molécules avec une efficacité antibactérienne font l'objet d'un développement (ECDC, 2009). La diminution des innovations en antibiologie et les possibilités de diffusions des bactéries, qui ne connaissent pas de frontières territoriales ou d'espèce, font de la résistance aux antibiotiques un problème mondial de santé publique (Boucher et al., 2013; Lancet, 2009). Cette partie détaille comment l'usage des antibiotiques, en médecines humaine et vétérinaire, peut générer des problèmes d'efficacité thérapeutique dans le traitement des maladies infectieuses.

1.2.1 Médecine humaine

La dissémination de la résistance aux antibiotiques peut se produire au niveau bactérien (dissémination de clones), au niveau des réplicons (dissémination plasmidique), ou au niveau des gènes (via les transposons). Ces trois niveaux de dissémination, coexistants dans la nature, sont en outre non seulement infectieux mais exponentiels, suite à la duplication bactérienne (Courvalin, 2005).

En médecine humaine, de nombreuses études ont montré le lien existant entre usage des antibiotiques et augmentation de la fréquence des résistances (Canton and Morosini, 2011), à la fois chez les bactéries pathogènes (Malhotra-Kumar et al., 2007; Seppala et al., 1995), et chez les bactéries constitutives du microbiote intestinal (Edlund and Nord, 2000) ou pharyngé (Fantin et al., 2009). A l'échelle d'une population, il est possible de relier également la consommation d'antibiotique avec le niveau de résistance. Par exemple, une prévalence plus importante des résistances a été observée dans les pays fortement consommateurs d'antibiotiques (Goossens et al., 2005). En fait, les bactéries du microbiote intestinal jouent le rôle de réservoir de gènes de résistance, gènes qui peuvent circuler entre bactéries non pathogènes et de bactéries non pathogènes à pathogènes (Donskey, 2006; Salyers et al., 2004). En effet coexistent dans le tractus

digestif des germes banals et des germes pouvant devenir pathogènes chez certains patients, comme des espèces d'entérobactéries et d'entérocoques. Les bactéries ayant acquis des résistances sont impliquées dans l'occurrence d'infections nosocomiales, qui entraînent des longs séjours en hôpital et sont souvent de pronostic réservé (de Kraker et al., 2011).

Des recherches récentes ont mis en évidence l'antériorité des résistances bactériennes à l'avènement de l'usage thérapeutique des antibiotiques. En effet des séquences d'ADN retrouvées dans le permafrost de Bering ont permis d'identifier des gènes de résistance retrouvés actuellement (D'Costa et al., 2011). Toutefois, l'usage croissant des antibiotiques a entraîné une augmentation des cas de patients infectés par des bactéries multirésistantes. Il a fallu attendre seulement quelques années après la découverte des antibiotiques pour observer les premiers échecs thérapeutiques (Singer et al., 2003). Toutefois après la seconde guerre mondiale durant la période des trente glorieuses, les fréquentes innovations en antibiothérapie masquèrent aisément ce phénomène. Actuellement, la forte diminution des découvertes de molécules avec des propriétés anti-infectieuses fait de la résistance aux antibiotiques un problème de santé publique (Boucher et al., 2013; 2009; Laxminarayan et al., 2013). Dans la dernière décennie, seule une vingtaine de projets de développements d'antibiotiques a été reportée (Boucher et al., 2013).

De nombreuses espèces bactériennes responsables d'infections présentent des mécanismes de résistance. Néanmoins, certaines espèces résistantes rencontrées couramment sont responsables d'affections sévères (Collignon, 2012). Les principales espèces d'intérêt recensées par l'ECDC (ECDC, 2009) et le Center for Disease Prevention and Control (américain) (CDC) sont soit des pathogènes « stricts » (eg *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*), soit des bactéries constitutives des flores commensales (eg Entérocoques, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*); soit des bactéries pathogènes d'origine alimentaire (eg *Campylobacter*, *Salmonella*). Les bactéries multirésistantes constituent une véritable menace en médecine de ville comme en médecine hospitalière. Les patients les plus fragiles sont les premières victimes des échecs thérapeutiques associés à ces bactéries. Mais la multirésistance complique aussi le traitement des infections chez des patients sans facteurs de risque particuliers (Laxminarayan et al., 2013). En 2009, l'ECDC estimait que l'antibiorésistance coûte chaque année en Union Européenne 1.5 milliards d'euros, et entraîne la mort de 25 000 personnes (ECDC, 2009). Les estimations du CDC rapportent 23 000 morts directement associées à l'antibiorésistance, 2 millions de patients atteints d'infection avec une bactérie résistante, pour des coûts directs de 20 milliards de dollars et des coûts indirects de 35 milliards de dollars (CDC, 2013).

1.2.2 Médecine vétérinaire

La sélection et la dissémination des bactéries qui sont pathogènes pour les animaux et non pathogènes pour l'homme ne constitue pas un risque majeur en médecine vétérinaire. Cette dissémination suit les mêmes mécanismes que ceux observés en médecine humaine. La corrélation entre consommation d'antibiotique et fréquence de résistances des bactéries de la flore commensale a été également mise en évidence en médecine vétérinaire, au sein de différentes espèces, notamment les animaux de production comme les bovins (Mann et al., 2011; Singer et al., 2008), les porcs (Bibbal et al., 2007; Nguyen et al., ; Wiuff et al., 2003) et les poulets (van Boven et al., 2003). Si la circulation des bactéries pathogènes est fréquente dans l'espèce humaine, elle semble être plus rare entre espèces animales et espèce humaine (Huijsdens et al., 2006; Munoz-Price et al., 2013). Toutefois, de nombreuses études ont mis en évidence des possibilités d'échanges entre l'Homme et l'animal d'espèces bactériennes zoonotiques (Graveland et al., 2010; van Loo et al., 2007; Voss et al., 2005), et de bactéries des flores commensales, en particulier digestive (Madec et al., 2012; Shaheen et al., 2013), qui font du transfert de l'homme à l'animal l'enjeu majeur lié à l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire.

En théorie, le transfert de résistance peut arriver dans tous les schémas où des supports de résistance sont présents et où il y a un mélange de différentes espèces bactériennes. Ces différentes possibilités de transfert sont additives et complexes ; elles incluent des transferts directs, par contact proche (aérosol ou manipulation) et indirects, *via* l'ingestion d'aliments souillés (Wooldridge, 2012). Trois types d'échanges bactériens (et donc de résistances) sont possibles entre les animaux de production et les hommes.

1. Les échanges directs de pathogènes zoonotiques, conséquence de la promiscuité entre l'homme et l'animal dans la production de denrées animales.

La contamination directe de l'homme par une espèce bactérienne zoonotique a été décrite dans plusieurs filières de production. En filière porcine par exemple, l'identification d'un clone de *S. aureus* (CC398) capable de coloniser les éleveurs a été établie en France dans les années 2000 (Armand-Lefevre et al., 2005). La colonisation peut être asymptomatique, et transitoire. Le risque de contracter ces maladies relève du risque professionnel. Pour ce clone, il a été montré que la fréquence du portage est 760 fois plus élevée chez les producteurs de porcs que dans la population générale (Voss et al., 2005). Plus récemment en production bovine, un autre clone de *S. aureus* a été isolé à la fois dans des prélèvements de mammite bovine et chez l'homme (Laurent et al., 2012).

2. La transmission de pathogènes zoonotiques résistants *via* la chaîne alimentaire.

Cinq pathogènes entraînent plus de 90% des infections d'origine alimentaire : *Salmonella*, *Listeria*, *Toxoplasma*, *Campylobacter*, *E.coli*, et norovirus (White et al., 2002). *Campylobacter* est un agent classique de diarrhée chez l'homme (Aarestrup and Wegener, 1999). Généralement banale, cette infection peut s'avérer fatale chez le sujet immunodéprimé. Le traitement habituel repose sur l'utilisation de quinolones ou de macrolides. Il a été montré que les résistances aux quinolones se sont développées rapidement suite à l'utilisation de cette famille d'antibiotiques en médecine vétérinaire aux Pays-Bas (Endtz et al., 1991). Concernant les Entérobactéries, de nombreux cas d'épidémies humaines d'origine animale ont été décrits notamment avec des souches de Salmonelles résistantes aux céphalosporines de 3ème et 4ème génération (Madec, 2012).

3. Le transfert de bactéries commensales par la consommation de denrées souillées.

Lors d'un traitement antibiotique, les bactéries des flores commensales et en particulier de la flore digestive des animaux traités sont quasi-systématiquement exposées aux antibiotiques administrés, qui exercent localement une pression de sélection favorisant la sélection et l'amplification des souches résistantes, dans ce qui constitue un réservoir de déterminants génétiques de résistances (Angulo et al., 2004). En effet, les flores digestives animales et humaines partagent certaines espèces bactériennes (entérocoques et *E. coli*), qui peuvent échanger des éléments génétiques mobiles de résistance par transfert horizontal. Plusieurs études ont montré la présence d'un pool de gènes de résistances dans les denrées alimentaires. La contamination de ces denrées peut survenir au cours des étapes initiales d'abattage des animaux, ou bien *via* le rejet des effluents d'élevages (litières et lisiers) dans l'environnement puis contamination secondaire des denrées (Wang et al., 2012).

La figure 1.1 positionne les enjeux de l'utilisation des antibiotiques en élevage, en termes de santé animale et de santé humaine.

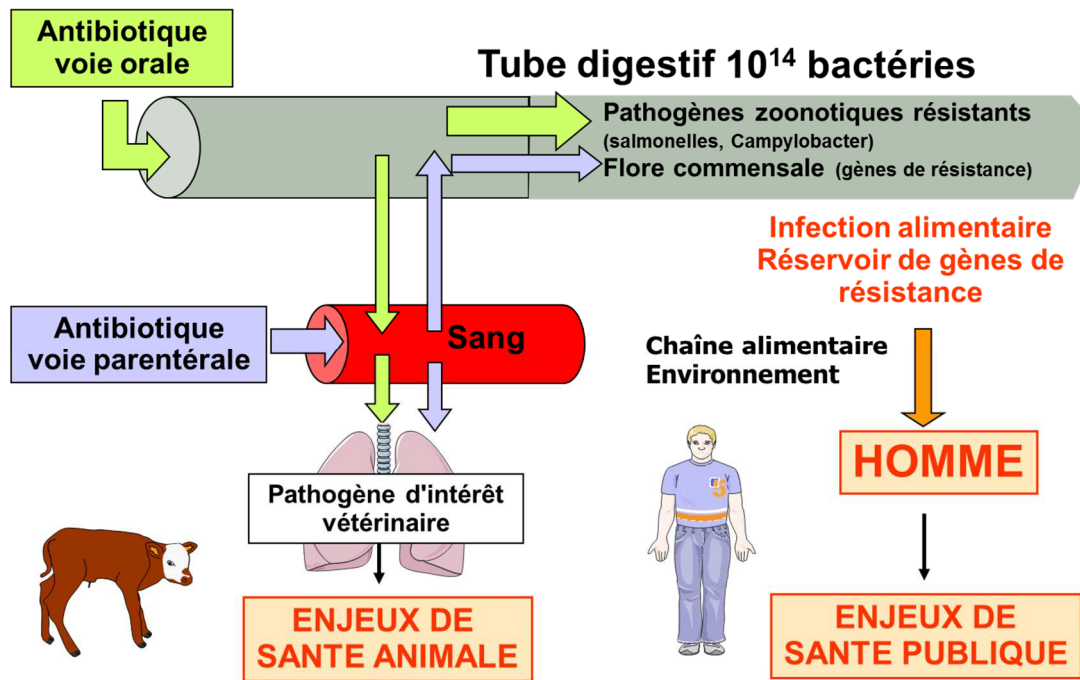


Figure 1-1 : Les flores bactériennes critiques pour l’antibiothérapie en élevage. Enjeux de santé animale et enjeux de santé publique.

Lors de l’administration d’un antibiotique, le développement de la résistance au niveau des flores cibles (foyers infectieux) et non cibles (flore commensale digestive) peut avoir un impact à la fois sur la santé animale et sur la santé publique. La fraction de l’antibiotique atteignant les segments distaux du tube digestif exerce une pression sélective importante sur le microbiote intestinal. Cela peut conduire à l’émergence de résistance parmi les bactéries zoonotiques (*Salmonelle*, *E. coli*, ...) et/ou la constitution d’un réservoir de gènes de résistance chez des bactéries non pathogènes pour l’homme mais pouvant servir de vecteur de diffusion de ces gènes de résistance dans l’environnement ou la chaîne alimentaire.

Les enjeux liés à l’antibiorésistance en antibiothérapie animale peuvent être envisagés *via* la définition d’un rapport bénéfice sur risque, qui prend en compte conjointement les bénéfices d’une antibiothérapie vis-à-vis de la santé animale (la guérison d’une infection bactérienne), et les risques de cette même antibiothérapie vis-à-vis de la santé humaine, que l’on peut positionner au niveau des flores digestives des animaux. En première analyse, ce rapport sera favorable lorsque le niveau d’efficacité contre le pathogène responsable d’une infection pourra contrebalancer la pression de sélection qui s’exercera quasi systématiquement (avec cependant des différences en termes d’intensité et de durée) sur les flores commensales de l’animal. Ce rapport bénéfice sur risque sera évoqué plus loin lors de la description des stratégies de traitement ciblé et de traitement métaphylactique des bronchopneumonies infectieuses des bovins.

1.2.3 Leviers de réduction de l'usage des antibiotiques en productions animales

Il est difficile de déterminer le risque de santé publique attribuable à l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire. Pourtant, l'existence d'externalités négatives sur la santé humaine, considérée comme un bien public global (Orzech and Nichter, 2008), justifie l'intervention du régulateur. Toutefois, le risque économique associé à la sous-utilisation d'antibiotiques, pouvant dégrader quantitativement et qualitativement les productions de denrées animales (Chi et al., 2002), impose aux pouvoirs publics de mettre en place des mesures équilibrées, les antibiotiques étant à la fois des biens de santé et des biens économiques (Vägsholm and Höjgard, 2010). La nécessaire réduction de l'usage des antibiotiques devra prendre en considération qu'ils restent incontournables pour la prise en charge d'une grande partie des infections bactériennes chez les animaux d'élevage.

La prise en charge du problème de santé publique lié à l'utilisation des antibiotiques fait l'objet de mesures diverses. La première option, d'ordre politique, consiste en la mise en place d'instruments limitant ou interdisant l'utilisation des antibiotiques (Carlet et al., 2012; Jarlier et al., 2012). En Europe, le Danemark a par exemple choisi de privilégier la suppression d'utilisation d'une classe thérapeutique d'antibiotique en élevage porcin (les céphalosporines de dernière génération), dont l'utilisation est commune à la médecine humaine et vétérinaire (Jensen et al., 2012), avec des résultats intéressants sur la diminution de la fréquence d'isolats d'*E. coli* résistantes en abattoir (Agerso and Aarestrup, 2013). En France, les professionnels des filières cunicole et porcine mettent en place des initiatives similaires, partagées par les acteurs des filières pour raisonner l'utilisation des antibiotiques (Coutelet G. et al., 2015; Hémonic et al., 2013).

La multiplication des recommandations européennes -Commission Européenne (UE, 2011) et Parlement Européen (Rosbach, 2012)- visant à raisonner la consommation d'antibiotiques porte à croire que des mesures internationales contraignantes pourraient émerger dans un avenir proche. En France, le Plan National de Réduction des Risques d'Antibiorésistance en Médecine Vétérinaire (Plan Ecoantibio 2012-2017), mis en place par le Ministère de l'Agriculture en novembre 2011, vise par exemple à atteindre un objectif global de réduction de 25% de l'usage des antibiotiques entre 2012 et 2017 (Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation de la Pêche et de la Ruralité, 2011). Plus récemment, la Loi d'Avenir pour l'Agriculture, votée au Parlement à l'automne 2014, encadre également les pratiques en matière d'usage, de prescription et de délivrance des antibiotiques, et ordonne une réduction de 25% de l'usage des antibiotiques d'importance critique entre 2013 et 2016.

Les leviers politiques ne constituent qu'une partie des instruments utilisables pour réduire l'usage des antibiotiques. Le modèle conceptuel proposé dans la figure 1 précise les facteurs influençant l'usage des antibiotiques et les leviers de réduction associés. L'article présenté dans le chapitre 2 de ce manuscrit s'attache à identifier les leviers implémentés par les pouvoirs publics et à les éclairer en détaillant le processus économique de consommation des antibiotiques en productions animales, mais également à imaginer d'autres leviers pouvant répondre à la problématique de réduction. Ainsi y seront abordés les leviers d'ordre institutionnel et économique. D'autres leviers peuvent être recherchés directement en médecine : il s'agirait de privilégier les meilleures alternatives de traitement en fonction des données épidémiologiques et pharmacologiques, pour d'une part raisonner les traitements des groupes d'animaux, et *in fine* diminuer le nombre d'animaux traités ; d'autre part optimiser les protocoles médicaux utilisés sur les animaux traités. Le travail expérimental, qui fait l'objet des chapitres 3, 4, 5 et 6, illustre comment en pratique la recherche médicale peut contribuer à la réduction d'usage des antibiotiques en production animale, à travers l'exemple du traitement des bronchopneumonies infectieuses bovines

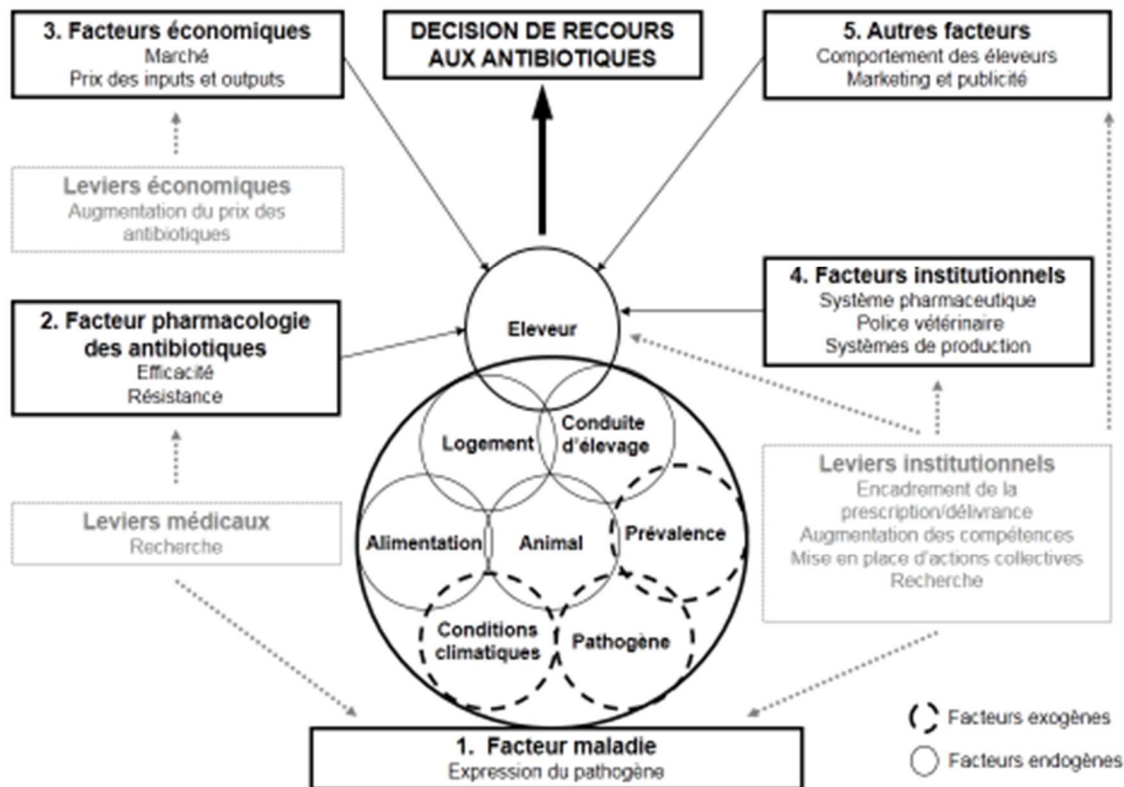


Figure 1-2 : Modèle conceptuel décrivant les principaux facteurs influençant les décisions individuelles de recours aux antibiotiques et les leviers de diminution.

1.3 Stratégies de réduction de l'usage des antibiotiques dans le traitement des bronchopneumonies infectieuses (BPI) bovines : état des connaissances

1.3.1 Usages des antibiotiques lors de BPI de bovins

En médecine vétérinaire bovine, les bronchopneumonies infectieuses constituent une des affections fréquentes, pouvant engendrer des pertes économiques fortes (Cusack et al., 2003; Fulton, 2009). Selon la gravité de la situation et le système d'exploitation, ces maladies entraînent, par exemple, une diminution de 11 à 26% du revenu des exploitations de jeunes bovins en Pays de la Loire (Bareille N, 2009). Bien que toutes les catégories d'animaux puissent être affectées, les jeunes animaux (veaux de boucherie, ou jeunes bovins-JB) sont les plus fréquemment atteints. Dans une étude conduite en atelier d'engraissement français, la fréquence des JB affectés par les BPI atteint 18% (Assie et al., 2009b). Leur apparition est associée à l'isolement d'agents pathogènes courants, virus (BVDV, BHV1, BRSV, PI3), et bactéries, qui peuvent être retrouvés seuls ou en association (Fulton, 2009). Les bactéries les plus fréquemment isolées lors d'épisodes de BPI sont les pasteurelles (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*) (Fulton, 2009). D'un point de vue médical, l'expression clinique de l'infection est très variable, allant de l'absence de signe à l'observation de signes cliniques locaux (écoulement nasal et oculaire, toux, tachypnée voire dyspnée) et/ou généraux (abattement, dysorexie voire anorexie) qui peuvent entraîner la mort de l'animal. Dans les challenges expérimentaux, des signes cliniques comme la toux, le jetage nasal, l'anorexie, l'abattement et la fièvre sont généralement observés (Hanzlicek et al., 2010; Reeve-Johnson, 2001).

En pratique courante, l'utilisation d'antibiotiques par voie générale pour la prise en charge des BPI est quasi systématique, compte-tenu de la faible spécificité des signes cliniques observés, de la grande fréquence d'implication des bactéries et de la difficulté d'identifier les infections virales pures. D'autre part, les contraintes structurelles rencontrées dans les ateliers de production, telles que les investissements liés aux bâtiments, les ressources humaines disponibles, limitent aussi les actions possibles de maîtrise des facteurs de risque et favorisent indirectement le recours aux antibiotiques (cf. chapitre 5). La prise en charge des BPI se fait principalement avec les céphalosporines, les macrolides et les fluoroquinolones (Forbes et al., 2011; Fulton, 2009; Nickell and White, 2010; Rice et al., 2007). D'autres molécules comme les phénicolés et les tétracyclines sont aussi utilisées de manière moins courante (Apley, 1997). En France, le rapport de suivi des ventes des antibiotiques publié annuellement par l'Anses, précise les évolutions des quantités, mais aussi de l'exposition des animaux aux différentes molécules.

Les antibiotiques disponibles pour le traitement des BPI présentent des caractéristiques pharmacologiques variables. Les deux qui peuvent influencer fortement sur le choix de la spécialité consistent en (i) la durée d'action : les spécialités disponibles sont soit à action courte (cas des fluoroquinolones, céphalosporines, tétracyclines), soit longue action (cas des macrolides, certaines céphalosporines, phénicolés) ; (ii) la posologie : le traitement peut être administré en une ou plusieurs fois.

Le choix d'une spécialité et donc d'un schéma posologique va avoir des conséquences à la fois sur la guérison clinique, et sur l'impact potentiel engendré sur la flore commensale de l'animal. Par exemple, l'utilisation d'un traitement à doses multiples ou de formulation longue action va permettre d'augmenter le temps de contact entre l'antibiotique et les bactéries pathogènes ciblées, mais également augmenter le temps d'exposition de la flore commensale à l'antibiotique, temps durant lequel les bactéries résistantes peuvent être sélectionnées (concept de fenêtre de sélection) (Zhao and Drlica, 2008).

D'autre part, deux principales stratégies se dégagent pour le traitement des BPI. Une première stratégie de traitement consiste à utiliser les antibiotiques de manière ciblée, sur les animaux détectés malades cliniquement (Heins et al., 2014; Hoar et al., 1998). Cette approche permet de limiter le nombre d'animaux exposés aux antibiotiques, et limite par là même les occasions de sélection de bactéries résistantes. Toutefois, elle nécessite une bonne observation des animaux, afin de détecter les signes cliniques de BPI et de traiter les animaux suffisamment tôt pour limiter au maximum les lésions pulmonaires. En effet, une détection tardive des malades pourrait entraîner une perte de chance pour la guérison (Schaefer et al., 2007).

La seconde stratégie de traitement, la plus communément répandue, est la métaphylaxie (Apley, 1997; Assie et al., 2009a; Nickell and White, 2010). Cette pratique consiste à intervenir, lorsque les BPI apparaissent au sein d'un lot ou d'une population donnée, en traitant simultanément tous les animaux du groupe : les animaux malades cliniquement, et les animaux sans signe clinique, mais qui présentent un risque avéré de développer la maladie. Parmi ces derniers, certains animaux sont déjà infectés et en incubation à un stade préclinique de la maladie et d'autres sont sains. Les pratiques courantes de la métaphylaxie privilégient l'utilisation de spécialités longue-action, en raison principalement de leur praticité (une seule injection de la spécialité longue-action est nécessaire, mais pratiquée sur tous les animaux du lot en même temps). Cette praticité constitue un facteur important du choix de l'éleveur de ce type de pratique (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001). Au final, l'association de la métaphylaxie (le traitement de tous les animaux en même temps annihilerait les possibilités de contaminations) avec les spécialités longue-action (permettant de

« couvrir » une période à risques de plusieurs jours) produit vraisemblablement un effet « d'assurance » chez l'éleveur qui le pousse à privilégier cette stratégie (Nickell and White, 2010). Par contre, le choix de la stratégie métaphylactique entraîne *de facto* le traitement d'animaux (infectés ou non) qui n'auraient pas déclenché la maladie en absence de traitement antibiotique. Ainsi, au-delà de l'augmentation évidente des quantités d'antibiotiques utilisées par rapport à une thérapie ciblée (Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001), le rapport bénéfice sur risque (tel que défini plus haut) de cette pratique apparaît moins favorable. Aussi, bien que la pratique métaphylactique apporte une réponse pertinente aux éleveurs pour la maîtrise des BPI, elle constitue un facteur de risque pour la santé publique (Nickell and White, 2010; Schwarz and Chaslus-Dancla, 2001).

In fine, les BPI représentent un objet d'étude riche et complexes : la variété dans les agents infectieux et dans les formes cliniques (inapparentes à suraiguës et sévères), la contagiosité, les moyens de lutte... sont autant de variables à questionner en regard du recours aux antibiotiques pour leur prise en charge.

1.3.2 Vers une réduction des usages d'antibiotiques pour réduire la consommation globale et l'impact potentiel sur les flores commensales

La réduction du risque d'émergence de souches bactériennes résistantes peut être envisagée à l'échelle individuelle en mobilisant trois principaux leviers.

1. Une réduction de l'impact des antibiotiques sur les flores commensales digestives. Elle pourrait être obtenue soit en employant des antibiotiques qui n'atteignent pas les segments distaux du tube digestif, soit en neutralisant les molécules après qu'elles aient atteint le tube digestif (Khoder et al., 2010).
2. Une réduction du nombre total d'animaux traités. La promotion des traitements ciblés par rapport à la métaphylaxie, diminuerait le nombre d'animaux exposés inutilement.
3. Une réduction des doses administrées par animal traité. Dans certaines situations bien précises, l'optimisation des posologies des antibiotiques pourrait conduire à une diminution des doses et permettrait de diminuer ainsi la pression de sélection sur les flores commensales. En respectant la contrainte de maintien de l'efficacité thérapeutique, cette réduction de dose peut être envisagée soit en réduisant la durée de traitement, soit en diminuant la dose administrée. C'est ce levier qui va faire l'objet de notre travail expérimental de recherche.

L'augmentation de la durée de traitement antibiotique est un facteur favorisant l'émergence de bactéries résistantes au sein des flores commensales, selon des travaux réalisés en médecine humaine et vétérinaire (Falagas et al., 2009; Kesteman et al., 2010; Schrag et al., 2001). En parallèle, de nouveaux schémas posologiques avec des durées de traitement plus courtes ont montré une efficacité thérapeutique équivalente à celle de traitements plus longs (Canton and Morosini, 2011; Zhao and Drlica, 2001, 2008).

D'autre part, une série de travaux réalisés *in vitro* et *in vivo* ont démontré la possibilité d'une réduction de la dose antibiotique nécessaire en présence d'un inoculum bactérien de taille réduite (Ferran et al., 2007; Ferran et al., 2011; Kesteman et al., 2009; Mizunaga et al., 2005; Morrissey and George, 1999; Vasseur et al., 2014). Dans un modèle murin d'infection respiratoire à *Pasteurella multocida*, la dose d'antibiotique nécessaire à la guérison clinique et bactériologique a été 40 fois plus faible chez les souris traitées précocement après l'inoculation de 10^3 CFU, que chez les souris recevant le même inoculum de départ mais traitées plus tardivement après l'apparition de symptômes cliniques (Ferran et al., 2011). Une telle réduction de dose pourrait se révéler particulièrement bénéfique en termes de santé publique (prévention de l'antibiorésistance au niveau des flores commensales). Ces résultats ont été confirmés dans un autre modèle d'infection respiratoire, développé avec des rats dixéniques dont la flore digestive était contrôlée, et qui a également permis d'établir que les doses nécessaires à l'éradication d'une charge bactérienne faible conduisaient à une réduction des résistances au niveau digestif (Kesteman et al., 2010 ; Vasseur et al., 2014).

L'implémentation en pratique courante, par exemple face aux BPI des bovins, d'une stratégie de traitement antibiotique précoce avec des doses optimales plus faibles, se heurte aux difficultés des infections naturelles, face auxquelles l'éleveur ou le praticien est confronté à deux inconnues : l'agent causal de la maladie, et l'ancienneté du processus d'infection ayant donné lieu à la maladie détectée. Il n'existe pas aujourd'hui d'outils diagnostiques permettant une identification rapide au chevet de l'animal de l'agent microbien responsable de la maladie (Duff and Galyean, 2007) et les seules informations disponibles sont de nature épidémiologique. Dans le cas des BPI, la réduction de la dose antibiotique utilisée pourrait être également conditionnée à la capacité de détecter précocement la maladie, à défaut de l'identification de l'agent causal. L'utilisation de systèmes de détection en continu et non spécifique de maladies (par détection des hyperthermies ruminales) a montré que la détection des cas cliniques par les éleveurs souffre d'un manque de sensibilité. En atelier de JB par exemple, seulement 25% des animaux présentant une hyperthermie sont détectés

par les éleveurs (Timsit et al., 2011). Ceci implique qu'à l'heure actuelle les animaux sont détectés et traités tardivement.

1.4 Positionnement du travail de recherche

1.4.1 Problématique et objectifs

L'identification des principaux leviers de réduction de l'usage des antibiotiques permet d'appréhender de manière globale quels sont les acteurs issus des secteurs publics et privés et comment ils peuvent s'engager dans la lutte contre l'antibiorésistance. A travers l'exemple des mesures implémentées par les pouvoirs publics en France, une étude bibliographique, qui fait l'objet du chapitre 2, poursuit l'objectif de répertorier ces leviers de manière générale, et d'étudier la pertinence d'une série de mesures politiques. Bien qu'il soit difficile d'évaluer quel levier serait à privilégier, et à ce titre, quelle recherche prioriser, les enjeux de santé publique associés à l'antibiorésistance justifient une mobilisation de l'ensemble des acteurs.

Ainsi, la recherche médicale peut contribuer à la maîtrise de l'antibiorésistance ; toutefois, étant donné les contraintes fortes associées à ce type de recherche (coûts élevés, nécessité d'intervention sur les animaux...), le choix du champ d'études doit être envisagé au regard des bénéfices quantitatifs (réduction de la consommation d'antibiotiques) et qualitatifs (évaluation de l'impact de la réduction) attendus. Des études documentant ces bénéfices sont d'autant plus pertinentes qu'elles se focalisent sur des pratiques courantes d'antibiothérapie, comme c'est le cas pour les BPI. L'ensemble des éléments issus de précédents travaux de recherche en microbiologie, pharmacologie et médecine vétérinaire bovine nous a poussé à faire l'hypothèse que la combinaison de traitements de courte action, avec des schémas thérapeutiques originaux adaptés à des charges bactériennes faibles et associés à des moyens de détection précoce des BPI chez les bovins, pourrait constituer une avancée majeure dans la prise en charge de ces maladies de manière plus durable. Pour ce faire, il est nécessaire de répondre aux questions suivantes :

Est-il possible d'optimiser les doses d'antibiotique en fonction des caractéristiques des BPI bovines d'origine bactérienne (agent causal, charge bactérienne), afin d'utiliser des doses plus faibles que la dose recommandée par l'Autorisation de Mise sur le Marché de l'antibiotique ?

Il est possible que le schéma thérapeutique puisse être optimisé, d'une part en fonction de l'agent infectieux responsable de l'affection, les bactéries pathogènes ne présentant pas la même

sensibilité aux antibiotiques (Kroemer et al., 2012; Portis et al., 2012; Valle et al., 2012), d'autre part en fonction de la charge bactérienne, comme cela a été mis en évidence chez les rongeurs (Ferran et al., 2011; Kesteman et al., 2009). Toutefois, ces ajustements de dose efficaces n'ont pas été testés dans l'espèce cible, avec les principaux pathogènes respiratoires bovins.

Est-il possible de mettre en place dans une situation de terrain un protocole thérapeutique qui permette de réduire les quantités d'antibiotiques nécessaires au traitement des BPI, tout en maintenant l'efficacité du protocole par rapport à des conditions standard ?

Bien que différents facteurs puissent influencer sur la décision de l'éleveur, le choix du traitement des BPI va dépendre principalement de la détection de la maladie et des spécialités pharmaceutiques disponibles. Aujourd'hui, celui-ci ne dispose (quasiment) pas de moyens lui permettant de connaître du vivant de l'animal l'agent causal de la BPI, et le stade de l'infection (débutante vs avancée). De plus, la majorité des médicaments enregistrés pour le traitement des maladies respiratoires le sont avec une posologie fixée pour un panel plus ou moins large d'agents infectieux rencontrés couramment.

Quel est l'impact de l'administration de différentes doses antibiotiques sur la flore digestive commensale des animaux traités ?

A ce jour, il existe peu de données permettant d'apprécier des différences entre schémas thérapeutiques en termes d'émergence de résistances au sein des flores commensales (Nguyen et al., 2012; Wiuff et al., 2003; Zaheer et al., 2013). L'analyse de l'impact de stratégies thérapeutiques, utilisant des doses différentes d'antibiotiques ou des spécialités présentant des propriétés pharmacologiques spécifiques pourrait fournir des arguments de choix des antibiotiques à privilégier, en associant les « coûts » de santé publique aux bénéfices thérapeutiques.

1.4.2 Hypothèses de recherche et méthodologie

Pour répondre à ces questions, le travail de recherche expérimental a été séquencé afin d'établir la possibilité de réduction de la dose antibiotique (preuve de concept) dans un premier temps, puis de tester sa faisabilité terrain ensuite.

Dans la première expérimentation, nous avons étudié l'activité de différentes doses de marbofloxacin sur des souches de *M. haemolytica* et de *P. multocida*. Nous avons d'abord étudié *in vitro* l'efficacité de la marbofloxacin sur des faibles et forts inocula bactériens. Puis nous avons

élaboré un modèle d'infection respiratoire sur des souris avec les mêmes pathogènes que ceux utilisés dans le temps expérimental *in vitro*, pour déterminer la possibilité de réduction de dose antibiotique en fonction du pathogène ciblé. L'efficacité de la marbofloxacin sur la guérison bactériologique a été mesurée.

Dans la deuxième expérimentation, nous avons construit un modèle expérimental d'infection respiratoire chez le veau, afin de déterminer l'efficacité de l'administration précoce d'une dose de marbofloxacin réduite par rapport à la dose recommandée par l'AMM. Les veaux ont été infectés avec des faibles inocula de *M. haemolytica*, et traités avec des doses différentes de marbofloxacin, dans les 3 h ou 36 h après l'inoculation. L'efficacité de la marbofloxacin sur l'élimination bactérienne, l'amélioration des signes cliniques et l'extension des lésions pulmonaires a été mesurée.

Dans la troisième expérimentation, nous avons étudié la faisabilité de l'utilisation d'une dose réduite de marbofloxacin pour le traitement des BPI chez le jeune bovin dans des conditions d'infections naturelles, sans diagnostic préalable de l'agent causal. Cent quatre-vingt-quinze JB ont été équipés de thermobolus, permettant l'enregistrement en continu de la température ruminale, et répartis dans 2 groupes de traitement. Les JB du premier groupe ont été traités avec une dose réduite de marbofloxacin, après détection de la maladie sur la base d'une augmentation de la température ruminale, et avant apparition des signes cliniques de BPI. Les JB du second groupe ont été traités avec la dose de marbofloxacin recommandée par l'AMM, après apparition de signes cliniques de BPI. L'efficacité du traitement et la quantité d'antibiotique consommée ont été mesurées dans les 2 groupes.

Sur ces JB, des prélèvements de fèces ont été réalisés à temps fixe après traitement, pendant la période de suivi qui s'étendait sur 40 jours. Ces prélèvements ont été analysés en vue d'identifier la présence d'entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones et d'évaluer l'impact d'une variation de la dose de marbofloxacin.

1.5 Références bibliographiques

- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., 1999, The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 1, 639-644.
- Acar, J.F., Moulin, G., 2012, Antimicrobial resistance: a complex issue. *Rev Sci Tech* 31, 23-31.
- Agerso, Y., Aarestrup, F.M., 2013, Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *J Antimicrob Chemother* 68, 569-572.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2010, Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8, 260-271.
- Angulo, F.J., Baker, N.L., Olsen, S.J., Anderson, A., Barrett, T.J., 2004, Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis* 15, 78-85.
- Apley, M., 1997, Antimicrobial therapy of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13, 549-574.
- Armand-Lefevre, L., Ruimy, R., Andremont, A., 2005, Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. *Emerg Infect Dis* 11, 711-714.
- Assie, S., Bareille, N., Beaudeau, F., Seegers, H., 2009a, Management- and housing-related risk factors of respiratory disorders in non-weaned French Charolais calves. *Prev Vet Med* 91, 218-225.
- Assie, S., Seegers, H., Makoschey, B., Desire-Bousquie, L., Bareille, N., 2009b, Exposure to pathogens and incidence of respiratory disease in young bulls on their arrival at fattening operations in France. *Vet Rec* 165, 195-199.
- Bareille N, S.H.T.E.A.S., 2009, T8-3.3.4 - Impact of respiratory disorders in young bulls during their fattening period on performance and profitability in France, In: International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics proceedings. International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics, pp. 296-296.

- Bentley, R., Bennett, J.W., 2003, What is an antibiotic? Revisited. *Adv Appl Microbiol* 52, 303-331.
- Bibbal, D., Dupouy, V., Ferre, J.P., Toutain, P.L., Fayet, O., Prere, M.F., Bousquet-Melou, A., 2007, Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in *Enterobacteriaceae* and excretion of blaTEM genes in swine feces. *Appl Environ Microbiol* 73, 4785-4790.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Benjamin, D.K., Jr., Bradley, J., Guidos, R.J., Jones, R.N., Murray, B.E., Bonomo, R.A., Gilbert, D., 2013, 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 56, 1685-1694.
- Bywater, R.J., 2004, Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 361-363.
- Canton, R., Morosini, M.I., 2011, Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 35, 977-991.
- Carlet, J., Jarlier, V., Harbarth, S., Voss, A., Goossens, H., Pittet, D., 2012, Ready for a world without antibiotics? The *Pensieres Antibiotic Resistance Call to Action*. *Antimicrob Resist Infect Control* 1, 11.
- CDC 2013. *Antibiotic Resistances Threats in the United States* (Center for Disease Control and Prevention).
- Chi, J., Weersink, A., VanLeeuwen, J.A., Keefe, G.P., 2002, The Economics of Controlling Infectious Diseases on Dairy Farms. *Canadian Journal of Agricultural Economics/Revue canadienne d'agroeconomie* 50, 237-256.
- Collignon, P., 2012, Clinical impact of antimicrobial resistance in humans. *Rev Sci Tech* 31, 211-220.
- Courvalin, P., 2005, Antimicrobial Drug Resistance: "Prediction Is Very Difficult, Especially about the Future". *Emerg Infect Dis* 11, 1503-1506.
- Courvalin, P., 2008, Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med* 264, 4-16.

- Coutelet G., Chauvin C., Jouy E., Le Bouquin S., G., M., 2015, Réduction de l'utilisation d'antibiotiques : la démarche de la filière cunicole. *TeMA Techniques et Marchés Avicoles* 33, 35-40.
- Cusack, P.M., McMeniman, N., Lean, I.J., 2003, The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J* 81, 480-487.
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011, Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457-461.
- de Kraker, M.E., Wolkewitz, M., Davey, P.G., Koller, W., Berger, J., Nagler, J., Icket, C., Kalenic, S., Horvatic, J., Seifert, H., Kaasch, A., Paniara, O., Argyropoulou, A., Bompola, M., Smyth, E., Skally, M., Raglio, A., Dumpis, U., Melbarde Kelmere, A., Borg, M., Xuereb, D., Ghita, M.C., Noble, M., Kolman, J., Grabljevec, S., Turner, D., Lansbury, L., Grundmann, H., 2011, Burden of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay associated with bloodstream infections due to *Escherichia coli* resistant to third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 66, 398-407.
- Donskey, C.J., 2006, Antibiotic regimens and intestinal colonization with antibiotic-resistant gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2, S62-69.
- Duff, G.C., Galyean, M.L., 2007, Board-invited review: recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *J Anim Sci* 85, 823-840.
- ECDC 2009. The bacterial challenge: time to react (European Centre for Disease Prevention and Control, 2009.), p. 54.
- Edlund, C., Nord, C.E., 2000, Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother* 46 Suppl 1, 41-48; discussion 63-45.
- Endtz, H.P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden, T., Mouton, R.P., 1991, Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother* 27, 199-208.

- EU 2003. Regulation (ec) no 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Official Journal of the European Union), p. 15 p.
- Européenne, U. 2009. Règlement (CE) N° 470/2009 du Parlement Européen et du Conseil (Journal Officiel de l'Union Européenne), p. 12.
- Falagas, M.E., Karageorgopoulos, D.E., Grammatikos, A.P., Matthaiou, D.K., 2009, Effectiveness and safety of short vs. long duration of antibiotic therapy for acute bacterial sinusitis: a meta-analysis of randomized trials. *Br J Clin Pharmacol* 67, 161-171.
- Fantin, B., Duval, X., Massias, L., Alavoine, L., Chau, F., Retout, S., Andreumont, A., Mentre, F., 2009, Ciprofloxacin dosage and emergence of resistance in human commensal bacteria. *J Infect Dis* 200, 390-398.
- Ferran, A., Dupouy, V., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2007, Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 4163-4166.
- Ferran, A.A., Kesteman, A.S., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009, Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3384-3390.
- Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2011, Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection. *Vet Microbiol* 148, 292-297.
- Forbes, A.B., Ramage, C., Sales, J., Baggott, D., Donachie, W., 2011, Determination of the duration of antibacterial efficacy following administration of gamithromycin using a bovine *Mannheimia haemolytica* challenge model. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 831-835.
- Fulton, R.W., 2009, Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Anim Health Res Rev* 10, 131-139.
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., Elseviers, M., 2005, Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 365, 579-587.

- Graveland, H., Wagenaar, J.A., Heesterbeek, H., Mevius, D., van Duijkeren, E., Heederik, D., 2010, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. *PLoS One* 5, e10990.
- Hanzlicek, G.A., White, B.J., Mosier, D., Renter, D.G., Anderson, D.E., 2010, Serial evaluation of physiologic, pathological, and behavioral changes related to disease progression of experimentally induced *Mannheimia haemolytica* pneumonia in postweaned calves. *Am J Vet Res* 71, 359-369.
- Heins, B.D., Nydam, D.V., Woolums, A.R., Berghaus, R.D., Overton, M.W., 2014, Comparative efficacy of enrofloxacin and tulathromycin for treatment of preweaning respiratory disease in dairy heifers. *J Dairy Sci* 97, 372-382.
- Hémonic, A., Chauvin, C., Corrége, I. 2013. Sensibiliser les éleveurs de porcs à un usage raisonné des antibiotiques : bilan, freins, motivations et pistes de travail (IFIP Insitut du Porc), p. 1.
- Hoar, B.R., Jelinski, M.D., Ribble, C.S., Janzen, E.D., Johnson, J.C., 1998, A comparison of the clinical field efficacy and safety of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease of cattle in western Canada. *Can Vet J* 39, 161-166.
- Huijsdens, X.W., van Santen-Verheувel, M.G., Spalburg, E., Heck, M.E., Pluister, G.N., Eijkelkamp, B.A., de Neeling, A.J., Wannet, W.J., 2006, Multiple cases of familial transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 44, 2994-2996.
- Jarlier, V., Carlet, J., McGowan, J., Goossens, H., Voss, A., Harbarth, S., Pittet, D., 2012, Priority actions to fight antibiotic resistance: results of an international meeting. *Antimicrob Resist Infect Control* 1, 17.
- Jensen, V.F., Emborg, H.D., Aarestrup, F.M., 2012, Indications and patterns of therapeutic use of antimicrobial agents in the Danish pig production from 2002 to 2008. *J Vet Pharmacol Ther* 35, 33-46.
- Kesteman, A.S., Ferran, A.A., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Sanders, P., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009, Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma

exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4740-4748.

Kesteman, A.S., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Sanders, P., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2010, Emergence of resistant *Klebsiella pneumoniae* in the intestinal tract during successful treatment of *Klebsiella pneumoniae* lung infection in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2960-2964.

Khoder, M., Tsapis, N., Domergue-Dupont, V., Gueutin, C., Fattal, E., 2010, Removal of residual colonic ciprofloxacin in the rat by activated charcoal entrapped within zinc-pectinate beads. *Eur J Pharm Sci* 41, 281-288.

Kroemer, S., Galland, D., Guerin-Fauble, V., Giboin, H., Woehrle-Fontaine, F., 2012, Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Vet Rec* 170, 53.

Lancet, 2009, Urgently needed: new antibiotics. *Lancet* 374, 1868.

Laurent, F., Chardon, H., Haenni, M., Bes, M., Reverdy, M.E., Madec, J.Y., Lagier, E., Vandenesch, F., Tristan, A., 2012, MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. *Emerg Infect Dis* 18, 1465-1467.

Laxminarayan, R., 2014, Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. *Science* 345, 1299-1301.

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O., 2013, Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13, 1057-1098.

Lhermie, G., 2010. Demande de médicaments en productions animales. Faculté de sciences économiques Montpellier.

Madec, J.Y., Haenni, M., Jouy, E., Granier, S., Weill, F.X., Le Hello, S. 2012. Les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de dernières générations : de l'animal à l'Homme. In *Bulletin Epidémiologique Santé animale - alimentation (Anses)*, pp. 37-39.

- Madec, J.Y., Poirel, L., Saras, E., Gourguechon, A., Girlich, D., Nordmann, P., Haenni, M., 2012, Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like bla(CTX-M-15)-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother* 67, 578-581.
- Malhotra-Kumar, S., Lammens, C., Coenen, S., Van Herck, K., Goossens, H., 2007, Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet* 369, 482-490.
- Mann, S., Siler, J.D., Jordan, D., Warnick, L.D., 2011, Antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* isolates in dairy cows following systemic treatment with ceftiofur or penicillin. *Foodborne Pathog Dis* 8, 861-867.
- Melnyk, A.H., Wong, A., Kassen, R., 2014, The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl* 8, 273-283.
- Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation de la Pêche et de la Ruralité 2011. Plan National De Réduction des Risques d'Antibiorésistance en Médecine Vétérinaire ECOANTIBIO 2017, p. 32 p
- Mizunaga, S., Kamiyama, T., Fukuda, Y., Takahata, M., Mitsuyama, J., 2005, Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 56, 91-96.
- Morrissey, I., George, J.T., 1999, The effect of the inoculum size on bactericidal activity. *J Antimicrob Chemother* 43, 423-425.
- Munoz-Price, L.S., Poirel, L., Bonomo, R.A., Schwaber, M.J., Daikos, G.L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M.K., Kumarasamy, K., Livermore, D.M., Maya, J.J., Nordmann, P., Patel, J.B., Paterson, D.L., Pitout, J., Villegas, M.V., Wang, H., Woodford, N., Quinn, J.P., 2013, Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13, 785-796.
- Nguyen, T.T., Chachaty, E., Huy, C., Cambier, C., de Gunzburg, J., Mentre, F., Andremont, A., 2012, Correlation between fecal concentrations of ciprofloxacin and fecal counts of resistant Enterobacteriaceae in piglets treated with ciprofloxacin: toward new means to control the spread of resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4973-4975.

- Nickell, J.S., White, B.J., 2010, Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26, 285-301.
- Orzech, K.M., Nichter, M., 2008, From Resilience to Resistance: Political Ecological Lessons from Antibiotic and Pesticide Resistance. *Annual Review of Anthropology* 37, 267-282.
- Pagel, S.W., Gautier, P., 2012, Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev Sci Tech* 31, 145-188.
- Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L., Stoltman, G., 2012, A ten-year (2000-2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex--*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni*--in the United States and Canada. *J Vet Diagn Invest* 24, 932-944.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., Claverys, J.-P., 2006, Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313, 89-92.
- Reeve-Johnson, L., 2001, Relationships between clinical and pathological signs of disease in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* type A1. *Vet Rec* 149, 549-552.
- Rice, J.A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D.C., Shewen, P.E., 2007, *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8, 117-128.
- Rosbach, A. 2012. on the Microbial Challenge – Rising threats from Antimicrobial Resistance (European Parliament), p. 24.
- Salyers, A.A., Gupta, A., Wang, Y., 2004, Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 12, 412-416.
- Schaefer, A.L., Cook, N.J., Church, J.S., Basarab, J., Perry, B., Miller, C., Tong, A.K., 2007, The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Res Vet Sci* 83, 376-384.
- Schrag, S.J., Pena, C., Fernandez, J., Sanchez, J., Gomez, V., Perez, E., Feris, J.M., Besser, R.E., 2001, Effect of short-course, high-dose amoxicillin therapy on resistant pneumococcal carriage: a randomized trial. *Jama* 286, 49-56.

- Schwarz, S., Chaslus-Dancla, E., 2001, Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* 32, 201-225.
- Seppälä, H., Klaukka, T., Lehtonen, R., Nenonen, E., Huovinen, P., 1995, Outpatient Use of Erythromycin: Link to Increased Erythromycin Resistance in Group A Streptococci. *Clinical Infectious Diseases* 21, 1378-1385.
- Shaheen, B.W., Nayak, R., Boothe, D.M., 2013, Emergence of a New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 2902-2903.
- Singer, R.S., Finch, R., Wegener, H.C., Bywater, R., Walters, J., Lipsitch, M., 2003, Antibiotic resistance--the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis* 3, 47-51.
- Singer, R.S., Patterson, S.K., Wallace, R.L., 2008, Effects of therapeutic ceftiofur administration to dairy cattle on *Escherichia coli* dynamics in the intestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 74, 6956-6962.
- Stockwell, V.O., Duffy, B., 2012, Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev Sci Tech* 31, 199-210.
- Timsit, E., Assie, S., Quiniou, R., Seegers, H., Bareille, N., 2011, Early detection of bovine respiratory disease in young bulls using reticulo-rumen temperature boluses. *Vet J* 190, 136-142.
- Trieu-Cuot, P., Derlot, E., Courvalin, P., 1993, Enhanced conjugative transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 109, 19-23.
- UE 2011. Communication de la Commission au Parlement Européen et au Conseil. Plan d'action pour combattre les menaces croissantes de la résistance aux antimicrobiens, 748, C., ed. (European Commission), p. 19.
- Vägsholm, I., Höjgard, S., 2010, Antimicrobial sensitivity – A natural resource to be protected by a Pigouvian tax? *Preventive Veterinary Medicine* 96, 9-18.
- Valle, M., Schneider, M., Galland, D., Giboin, H., Woehrlé, F., 2012, Pharmacokinetic and pharmacodynamic testing of marbofloxacin administered as a single injection for the treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther* 35, 519-528.

- van Boven, M., Veldman, K.T., de Jong, M.C., Mevius, D.J., 2003, Rapid selection of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* but not in *Escherichia coli* in individually housed broilers. *J Antimicrob Chemother* 52, 719-723.
- van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A., Kluytmans, J., 2007, Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 13, 1834-1839.
- Vasseur, M.V., Laurentie, M., Rolland, J.G., Perrin-Guyomard, A., Henri, J., Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2014, Low or high doses of cefquinome targeting low or high bacterial inocula cure *Klebsiella pneumoniae* lung infections but differentially impact the levels of antibiotic resistance in fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1744-1748.
- Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wulf, M., 2005, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis* 11, 1965-1966.
- Walsh, C., 2003, antibiotics: actions, origins, resistance. American Society for microbiology, 335 p.
- Wang, H., McEntire, J.C., Zhang, L., Li, X., Doyle, M., 2012, The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Rev Sci Tech* 31, 249-260.
- White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D., McDermott, P.F., 2002, Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes Infect* 4, 405-412.
- Wiuff, C., Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., Aarestrup, F.M., 2003, The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs. *Res Vet Sci* 75, 185-193.
- Wooldridge, M., 2012, Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev Sci Tech* 31, 231-247.
- Zaheer, R., Cook, S.R., Klima, C.L., Stanford, K., Alexander, T., Topp, E., Read, R.R., McAllister, T.A., 2013, Effect of subtherapeutic vs. therapeutic administration of macrolides on antimicrobial resistance in *Mannheimia haemolytica* and enterococci isolated from beef cattle. *Front Microbiol* 4, 133.
- Zarb, P., Goossens, H., 2012, Human use of antimicrobial agents. *Rev Sci Tech* 31, 121-133.

Zhao, X., Drlica, K., 2001, Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 33 Suppl 3, S147-156.

Zhao, X., Drlica, K., 2008, A unified anti-mutant dosing strategy. *J Antimicrob Chemother* 62, 434-436.

2. CHAPITRE 2. FACTEURS DETERMINANTS ET LEVIERS DE REDUCTION DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES EN PRODUCTIONS ANIMALES

Etude bibliographique: Facteurs déterminants et leviers
de réduction de l'usage des antibiotiques en productions
animales

Par G. Lhermie, D. Raboisson, S. Krebs, P. Dupraz

ECONOMIE RURALE n°348 juillet-août 2015

2.1 Résumé en français

La sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques transmissibles à l'homme, induite par l'usage des antibiotiques en productions animales, incite les pouvoirs publics à réduire leur utilisation, dans le cadre du Plan Ecoantibio 2012-2017 et de la Loi d'avenir pour l'agriculture. Cet article questionne la pertinence des mesures en cours d'implémentation par les administrations françaises au regard d'un cadre d'analyse, regroupant dans un modèle conceptuel l'ensemble des facteurs sanitaires, économiques et institutionnels déterminant la demande d'antibiotiques. La compréhension des clés d'usage des antibiotiques, produit banal et substituable, ou au contraire ressource particulière, soumise à prescription, permet également d'envisager d'autres politiques de réduction.

Mots-clés : antibiotique, antibiorésistance, analyse économique, productions animales, politiques publiques

2.2 Abstract

The growing concern of the selection of bacteria resistant to antimicrobials and their possible transmissions to humans lead French Authorities to implement several legislative measures to decrease antimicrobial use in livestock production. This context leads to question whether the demand of antimicrobials could be regarded as a simple demand of agricultural input, or rather as a demand of an input with distinctive effects, submitted to regulatory prescription. In this paper, the accuracy of the regulatory measures implemented by the Authorities are assessed, regarding the whole factors gathered in a conceptual framework enlightening the decision-making process of antimicrobial use. Lastly, other alternative policies are described.

Keywords: antimicrobials; antimicrobial resistance; economic analysis; livestock production; agricultural policy.

2.3 Introduction

Découverts dans les années 1930, les antibiotiques sont utilisés dans la lutte contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne (Bentley et Bennett, 2003). Chez les animaux de rente, les antibiotiques sont utilisés dans trois circonstances : (i) en médecine individuelle, pour traiter un animal malade (traitement curatif) ; (ii) en médecine collective, pour traiter des lots d'animaux, lorsqu'une proportion du lot est malade (métaphylaxie) ; (iii) en prévention, avant l'apparition de la maladie, en traitant l'ensemble des animaux d'un lot pour lequel la probabilité de survenue de la maladie est considérée comme élevée (antibioprévention ou antibioprophyllaxie).

En soignant certaines maladies ou en cherchant à prévenir leur survenue, les traitements antibiotiques répondent à des enjeux (i) de bien-être animal, dans le cadre de l'optimisation de la qualité des soins ; (ii) économiques, dès lors que les animaux sont élevés pour produire des denrées animales, et (iii) de santé publique, dans la lutte contre les maladies infectieuses contagieuses et particulièrement les zoonoses (maladies animales pouvant être transmises à l'homme) (Lhermie, 2010). Bien que leur intérêt médical ne soit pas remis en question, l'usage des antibiotiques comporte néanmoins des risques. Les risques directs pour la santé des animaux ou des consommateurs demeurent minimales : depuis la Loi de 1975 relative à la pharmacie vétérinaire, la mise sur le marché et la vente des médicaments sont réglementées ; la création en 1994 de l'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV), intégrée en 2010 à l'Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments de l'environnement et du travail (Anses), a pour mission d'évaluer l'efficacité et l'innocuité des médicaments avant et après leur mise sur le marché. En revanche, le recours aux antibiotiques engendre une externalité majeure, qualifiée d'usure des antibiotiques, qui s'exprime en santé animale et surtout en santé humaine (Singer *et al.*, 2003). L'usure précoce des molécules se traduit par une inactivité progressive des antibiotiques sur les bactéries, alors dites résistantes aux antibiotiques. Certaines bactéries résistantes, sélectionnées sous la pression d'usage des antibiotiques, peuvent être disséminées chez l'homme, soit par le biais d'une proximité homme-animal, soit *via* la chaîne alimentaire (Angulo *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2012). Depuis les années 1990, des politiques publiques ont été mises en place pour atténuer ce risque : l'augmentation en médecine hospitalière de la prévalence des entérocoques résistants aux glycopeptides dans les années 1990 a ainsi conduit à l'interdiction de l'usage de l'avoparcine en médecine vétérinaire ; en 2000, le Parlement européen a interdit l'usage des antibiotiques à des doses subthérapeutiques dans l'alimentation animale comme promoteurs de

croissance, réservant l'usage des antibiotiques aux seuls traitements à visées curative ou préventive (European Union, 2003). En novembre 2011, l'Union européenne s'est engagée dans un plan de maîtrise du risque de santé publique associé à l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire. En France, le Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire (Plan Ecoantibio, 2012-2017), annoncé par le ministère de l'Agriculture en novembre 2011, vise par exemple à réduire l'usage des antibiotiques de 25 % entre 2012 et 2017 (ministère de l'Agriculture de l'Alimentation de la Pêche et de la Ruralité, 2011). La Loi d'avenir pour l'agriculture (LAA), votée au Parlement à l'automne 2014, encadre également les pratiques en matière d'usage, de prescription et de délivrance des antibiotiques, et impose une réduction de 25 % de l'usage des antibiotiques d'importance critique¹ entre 2013 et 2016. Ces éléments de régulation renforcent principalement l'encadrement de l'usage des antibiotiques en productions animales, en raison du devenir de ces productions (intégrant la chaîne alimentaire humaine), et des volumes d'antibiotiques consommés par les animaux de rente. En 2005, la quantité d'antibiotiques consommée en France s'établissait ainsi à 1 320 tonnes d'antibiotiques en médecine vétérinaire, contre 760 tonnes en médecine humaine (Moulin *et al.*, 2008). Les animaux de compagnie ne représentaient que 2 % du tonnage consommé en médecine vétérinaire en 2011 (Chevance et Moulin, 2012)².

Indépendamment des aspects strictement sanitaire, les antibiotiques utilisés en élevage peuvent être vus comme des inputs contribuant à la réalisation d'un objectif économique, en œuvrant pour la « bonne » santé du troupeau et sa productivité (McInerney, 1996). Le contexte de réduction de l'usage des antibiotiques conduit à analyser les déterminants de leur demande dans les filières de production d'animaux de rente. Cet article se propose, dans une première section, de montrer en quoi la consommation d'antibiotiques en productions animales répond à un problème économique, en s'appuyant premièrement sur un cadre d'analyse couramment utilisé en économie de la santé animale, avant d'aborder les facteurs influençant leur consommation. Ce cadrage est ensuite mobilisé dans la section suivante qui examine, de manière théorique et à la lueur d'une revue bibliographique, les leviers implémentés entre 2012 et 2014 par les politiques publiques visant à réduire l'impact de ces facteurs sur la consommation d'antibiotiques ; des leviers alternatifs y sont également proposés.

¹ En médecine humaine, les antibiotiques d'importance critique correspondent aux classes thérapeutiques utilisées pour traiter des maladies graves sans autre alternative selon des critères définis par l'Organisation mondiale de la santé. La liste d'antibiotiques critiques encadrée par la LAA comprend aujourd'hui les fluoroquinolones et les céphalosporines de 3^e et 4^e générations.

² Comme en médecine humaine, la demande d'antibiotiques pour le soin des animaux de compagnie répond très majoritairement à des objectifs strictement médicaux et ne sera pas discutée dans cet article.

2.4 Les antibiotiques : des inputs au service de la maîtrise des maladies

En dégradant la santé des animaux, les maladies infectieuses altèrent quantitativement et qualitativement l'output, l'efficacité des inputs et *in fine* le revenu de l'éleveur. Cette section propose en premier lieu un cadre d'analyse théorique des facteurs d'apparition des maladies, de leurs impacts, et de l'usage des antibiotiques pour leur contrôle. La dernière partie de cette section s'attache à préciser les autres facteurs pouvant affecter l'usage des antibiotiques, non abordés par le cadre théorique.

2.4.1 Facteurs d'apparition exogènes et endogènes des maladies

Les maladies infectieuses sont la conséquence de la présence simultanée d'un agent pathogène et d'un « terrain » propice à l'émergence de la maladie. La probabilité d'apparition d'une maladie dépend donc à la fois de facteurs exogènes, qui s'imposent à l'éleveur, mais aussi de facteurs endogènes, qui sont maîtrisables par l'éleveur (*figure 1*).

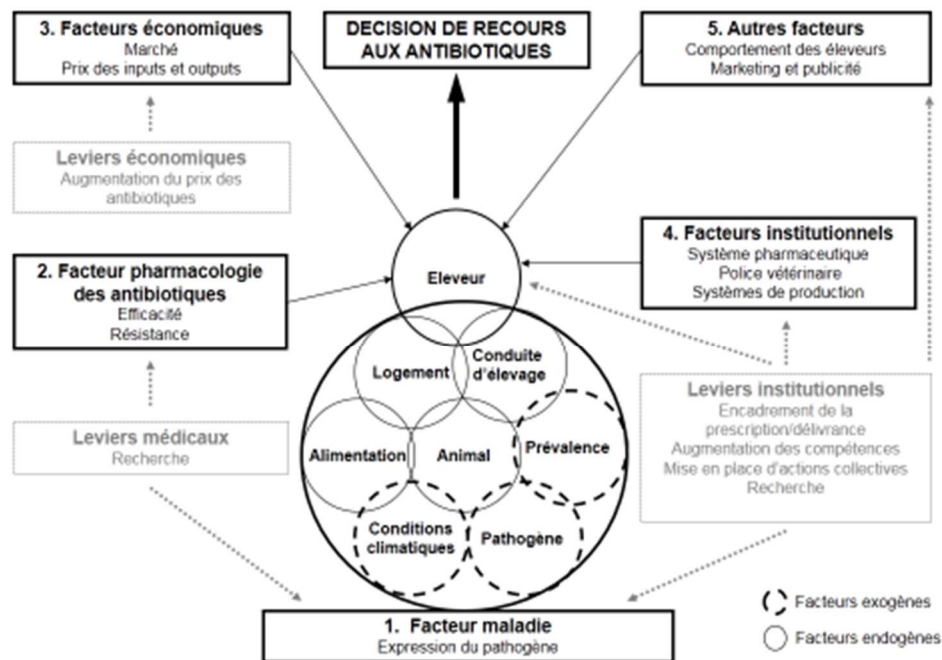


Figure 2-1 : Modèle conceptuel décrivant les principaux facteurs influençant les décisions individuelles de recours aux antibiotiques et les leviers de diminution. Source : les auteurs.

Les conditions climatiques constituent un exemple de facteurs exogènes, dans la mesure où ils influent sur la maladie, comme l'illustre par exemple la saisonnalité des troubles respiratoires d'origine infectieuse chez le jeune bovin, plus fréquents en période hivernale (Cernicchiaro *et al.*, 2012). La prévalence régionale (qui s'apparente à un risque de contracter la maladie) constitue également un facteur exogène pour une exploitation. Elle est susceptible de varier fortement en fonction des conditions climatiques, de critères caractérisant la maladie (contagiosité, morbidité, létalité), de ses modalités de transmission, et de l'intensité et l'efficacité des moyens de lutte mis en œuvre.

A contrario, l'alimentation constitue un facteur endogène. Bien que l'aliment soit un input directement lié à la croissance des animaux, des désordres qualitatifs et/ou quantitatifs de la ration distribuée peuvent avoir des conséquences pathologiques. Par exemple, des carences d'apport en oligo-éléments de la ration augmentent la sensibilité des vaches laitières aux infections de la mamelle (Spears et Weiss, 2008). De même, les conditions de logement (type, ventilation, surface, entretien) représentent un facteur de risque de maladies (Assié *et al.*, 2009a). Les caractéristiques propres de l'animal (race, âge, poids, sexe, stade de production) sont également liées au risque de maladies. Par exemple, leur relation avec l'incidence de troubles respiratoires a été mise en évidence chez le jeune bovin (Snowder *et al.*, 2006). La récente cartographie du génome des animaux a permis de mettre en évidence des associations entre des gènes et des caractères de résistance aux maladies infectieuses, par exemple pour les mammites ou la tuberculose (Berry *et al.*, 2011). Enfin, la conduite d'élevage, qui regroupe les objectifs fixés par l'éleveur (production, âge du premier vêlage, saison de vêlage, hors-sol) ainsi que ses pratiques d'élevage – incluant les mesures sanitaires médicales ou zootechniques préventives – sont de nature à agir sur l'incidence et la contagiosité des maladies. Dans une étude récente menée en France, Raboisson *et al.* (2012) mettent ainsi en évidence une relation entre la dégradation de la qualité cytologique du lait (qui traduit la présence de mammites subcliniques) et l'âge au premier vêlage, le nombre de vaches, les taux de renouvellement et la présence d'un atelier viande au sein de l'exploitation laitière. En matière d'analyse des déterminants d'usage des antibiotiques, ces différents facteurs sont qualifiés d'endogènes, car ils relèvent directement des décisions de l'éleveur. La plupart des facteurs endogènes présentent la caractéristique d'être également des facteurs de production. Ceci implique que les maladies vont donc impacter la quantité et la qualité d'output, tout en étant liées à la quantité d'inputs employée, d'une part parce que ces inputs influent sur le risque de survenue de la maladie, d'autre part parce que la maladie influe sur la quantité d'input nécessaire pour la production.

2.4.2 Impact des maladies sur le processus de production

Les maladies infectieuses s'accompagnent de conséquences économiques défavorables sur la production des élevages :

- elles peuvent réduire la quantité ou la qualité de l'output (*e.g.* mortalité animale) ;
- elles peuvent diminuer la productivité des inputs utilisés dans le processus de production (*e.g.* baisse du Gain moyen quotidien [GMQ], ou hausse de l'Indice de consommation [IC]).

Il est possible de formaliser la production à l'échelle d'un atelier de production. L'approche développée par McInerney *et al.* (1992) intègre ainsi, par le biais de la fonction de production, les interactions entre les différents facteurs de production. Cette fonction postule une relation entre la quantité produite, notée Q (lait ou viande par exemple) et la quantité d'inputs. Deux classes d'inputs peuvent être distinguées (Chi *et al.*, 2002) :

- les facteurs variables directement liés à la production, notés X , qui disparaissent dans le processus de production (alimentation, autres charges variables, hormis les inputs de contrôle des dommages liés à la maladie, *cf.* ci-dessous) ;
- des facteurs de production qualifiés de quasi-fixes, notés K (logement, travail, cheptel...). Ces facteurs à l'origine des charges de structure, se dégradent à l'usage et doivent être entretenus et renouvelés ; ils ne disparaissent pas dans le cycle de production de court à moyen termes.

La fonction de production en présence de maladie M s'écrit alors :

$$Q = f(X, M / K) \quad (1)$$

L'hypothèse de productivité marginale décroissante de chaque input variable permet l'existence d'un maximum du profit à court terme. Cette hypothèse, en général vérifiée, signifie que l'augmentation de volume d'output se fait à taux décroissant avec l'augmentation des quantités employées de chaque input (*figure 2*). La formalisation retenue présente l'intérêt de décrire la technologie de production de manière très simplifiée, ce qui permet de comprendre comment les changements au sein du processus vont conditionner les choix de l'éleveur. L'apparition d'une maladie au sein du processus de production a pour conséquence une baisse de la productivité des facteurs de production. La fonction de production se déplace vers le bas avec l'intensité de la maladie M (*figure 2*).

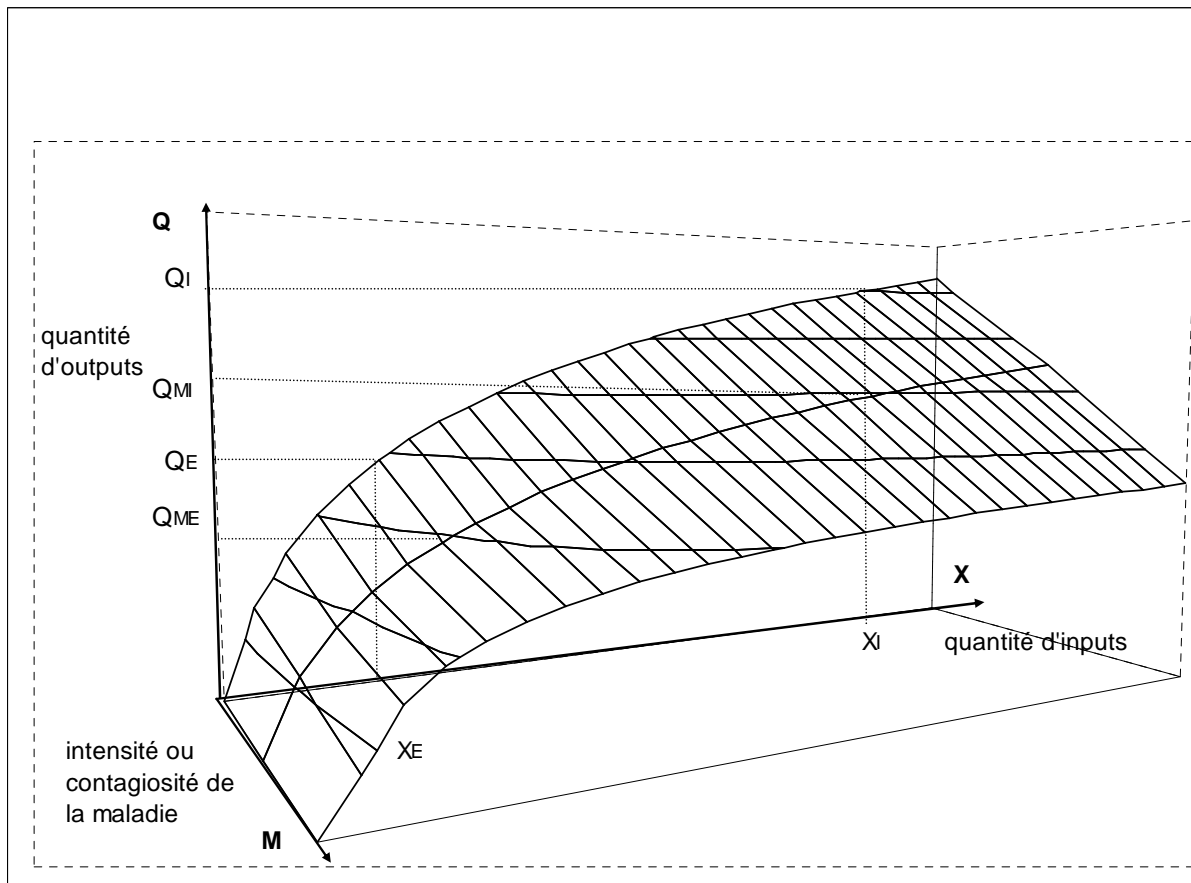


Figure 2-2: Représentation tridimensionnelle des effets de la maladie sur la fonction de production. Sur l'axe x sont représentés les inputs X (X_I usage intensif, X_E usage extensif) ; l'axe z représente l'intensité ou la contagiosité de la maladie M ; l'axe y représente les outputs Q (sans maladie Q ou avec maladie QM). Source : les auteurs.

L'impact de la maladie M sera variable en fonction des caractéristiques biologiques, (*e.g.* faible ou forte mortalité), mais également en fonction de son expression dans le troupeau (*e.g.* faible ou forte contagiosité). Cela se traduit graphiquement par un déplacement plus ou moins important de la courbe vers le bas, et une déformation de la courbe en présence de la maladie.

Par ailleurs, l'impact de la maladie sur un élevage utilisant de manière intensive l'input (X_I) va entraîner des pertes supérieures à celles subies par un élevage faisant un usage plus faible de cet input ($X_E < X_I$). L'intérêt de la maîtrise de la maladie varie ainsi en fonction des caractéristiques intrinsèques de la maladie, mais aussi en fonction de la conduite initiale du troupeau caractérisée par un usage plus ou moins intensif de l'input X . La réaction de l'éleveur à la survenue d'une maladie M , considérée ici comme une variable continue, peut comprendre à la fois un usage d'inputs de contrôle des dommages (médicaments et frais de prise en charge du sanitaire), notés CD , et un ajustement de la quantité d'inputs X .

2.4.3 Rentabilité du traitement et sensibilité aux prix

L'équation (1) traduit l'existence d'une relation entre les différents facteurs de production et la quantité d'outputs, mais ne renseigne pas directement sur le coût de la maladie. De plus, il est raisonnable de supposer qu'il est extrêmement difficile, sinon impossible, de ramener à zéro le niveau des pertes économiques induites par la maladie ; ceci implique que la variable pertinente n'est pas le coût total de la maladie mais le coût des pertes évitables avec un investissement en inputs de contrôle de dommages. Pour la plupart des maladies, l'évaluation des pertes induites par la maladie peut s'avérer complexe. La difficulté de cette estimation, associée au fait qu'elle ne permet pas de connaître le niveau optimal d'inputs de contrôle des dommages à utiliser, conduit à privilégier une méthode de calcul qui évalue le bénéfice de la maîtrise (Tisdell, 1995). Elle consiste à établir une relation entre le bénéfice (les pertes évitées) (B) et le niveau des dépenses de maîtrise engagées (CD), matérialisé sur la *figure 3*:

$$B = f(CD) \quad (2)$$

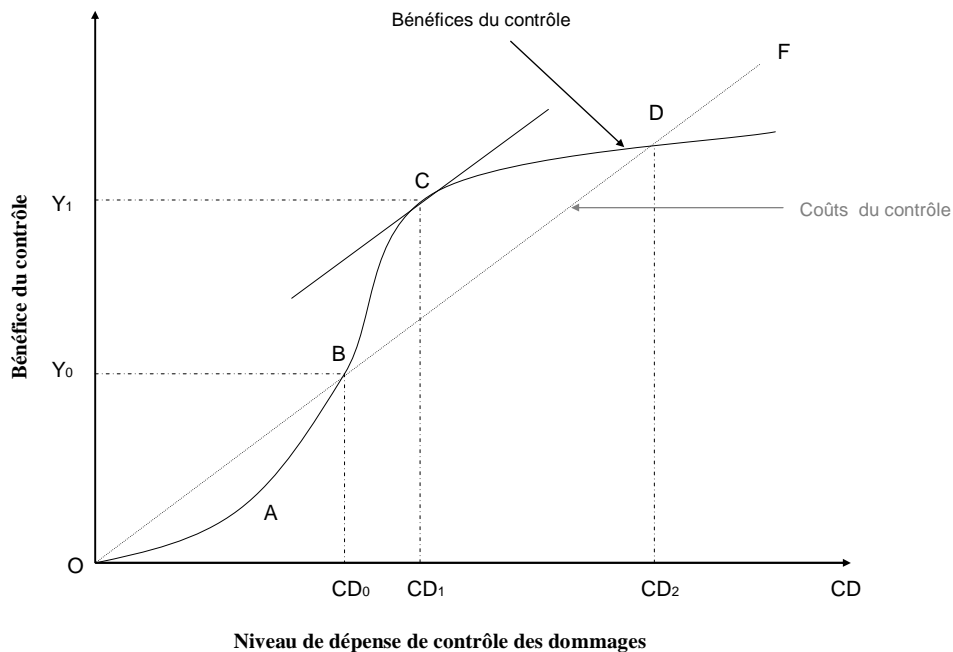


Figure 2-3: Modèle coût-bénéfice de l'utilisation d'un traitement dans une situation où existe un effet de seuil: Dans cette représentation, l'intensité de la maladie est constante. Source : d'après Tisdell, 1995.

Si la fonction de bénéfice croît à taux décroissant (du point B au point D), le bénéfice maximal sera obtenu pour une valeur de CD pour laquelle les bénéfices de la maîtrise seront équivalents aux coûts de maîtrise (point C). En pratique, il est possible que la maîtrise ne soit jamais rentable, en raison par exemple d'un coût fixe incompressible (*e.g.* une quantité minimale d'antibiotique à utiliser pour le traitement d'une maladie) supérieur au bénéfice maximal susceptible d'être retiré de la maîtrise. En élevage bovin laitier par exemple, l'utilisation des antibiotiques dans le traitement des mammites subcliniques des vaches en lactation n'est rentable que lorsque la fréquence des mammites est élevée (Swinkels *et al.*, 2005). Dans ce cas, l'éleveur tolère les pertes, et la situation suboptimale ne requiert pas toujours le recours aux antibiotiques. Le bénéfice est maximisé quand $CD_1 = Y_1$ est dépensé. La présence de coûts fixes engendre des seuils au-delà desquels l'utilisation d'antibiotique devient rentable. Un minimum $CD_0 = Y_0$ de dépense doit être réalisé avant de pouvoir obtenir un bénéfice couvrant les dépenses engagées. Au-delà de CD_2 , toute dépense de maîtrise supplémentaire n'est pas rentable. Dans ce cas, le seuil n'est pas associé à un coût initial incompressible. C'est la connaissance empirique de la maladie, et de ses modalités de traitement qui permet de déterminer la forme de la fonction de bénéfice.

Dans la pratique, l'éleveur peut considérer les antibiotiques comme un facteur de production et décider de les utiliser en fonction du gain attendu du traitement. Le contrôle des dommages peut être considéré comme un processus économique, dans lequel l'augmentation des inputs vétérinaires génère un output supplémentaire qui prend la forme d'une réduction des pertes. La rationalité économique conduit à ne recourir aux antibiotiques que dans les situations où leur utilisation s'avère rentable, ce qui signifie qu'il existe un optimum économique de maîtrise des maladies, dépendant des prix de l'output et des inputs vétérinaires.

La nature économique de l'input 'antibiotique', utilisé comme input de contrôle de dommages dans le cadre de la production, rend son niveau d'utilisation sensible au prix. Une diminution du prix des antibiotiques tend à accroître la quantité consommée. Une telle relation a par exemple été mise en évidence en production intensive, où l'introduction de génériques de fluoroquinolones sur le marché des antibiotiques autorisés en production aviaire s'est accompagnée d'un accroissement sensible des quantités consommées (Chevance et Moulin, 2009). En effet, l'introduction de génériques a pour effet de diminuer le prix des spécialités mises sur le marché, ce qui diminue le coût de contrôle des dommages. La courbe de la fonction de bénéfice se déplace vers la gauche, et entraîne une augmentation du bénéfice jusqu'à ce que le bénéfice marginal, décroissant avec le niveau de traitement, égale le coût marginal constant ou croissant. L'augmentation du prix de l'output, ou la diminution du prix des autres inputs, accroît également la consommation

d'antibiotiques, en décalant la fonction de bénéfice du contrôle des dommages vers le haut. En considérant que la productivité croît à taux décroissant (*figure 2*), une augmentation du prix des produits est de nature à inciter l'éleveur à augmenter la quantité produite, impliquant une augmentation de la consommation d'inputs.

Du point de vue théorique, l'optimisation de l'usage des antibiotiques ne considère pas d'autres aspects sanitaires de la maladie (douleur, bien-être), et repose sur plusieurs hypothèses majeures. Pour décider, l'éleveur doit disposer de toutes les informations concernant la maladie (physiopathologie, épidémiologie) et les bénéfices qu'il peut retirer du traitement antibiotique. Ce cadre, bien que faiblement réaliste, demeure intéressant pour évaluer la capacité du traitement à diminuer les pertes imputables à la maladie, ainsi que pour étudier les variations des quantités utilisées dans un contexte donné (prix de marché, incidence de la maladie...). Il permet donc de bien comprendre la pertinence de mise en place de taxes, réglementations sur les quantités ou prix des antibiotiques. Cette approche occulte néanmoins les questions de substitution entre les facteurs de production, l'attitude de l'éleveur face au risque, l'influence de facteurs externes ou encore la présence d'externalités.

2.4.4 Autres facteurs influençant la consommation d'antibiotiques

En réalité, la demande d'antibiotiques par les éleveurs est influencée par plusieurs facteurs. Lors du choix de recourir (ou non) à un traitement antibiotique, toutes les alternatives ne sont pas connues et les conséquences évaluées par les éleveurs (Kristensen et Jakobsen, 2011). Dans le cas d'un traitement préventif, il est possible que la maladie ne se déclare pas, et les dépenses de maîtrise viennent alors diminuer le bénéfice de l'éleveur. Dans le cas d'un traitement curatif, une incertitude pèse également sur l'efficacité attendue du traitement. La décision de l'éleveur de recourir aux antibiotiques sera prise à la lumière de savoirs et savoir-faire, qui pourront être modulés par des facteurs intrinsèques au comportement de l'éleveur, ainsi que par l'environnement dans lequel il évolue. En élevage de ruminants, il a été montré que l'action en situation d'incertitude varie en fonction des différents leviers d'action dont dispose l'éleveur, qui seront mobilisés avec des logiques individuelles (Lemery *et al.*, 2005). Des résultats récents, issus d'enquêtes réalisées en élevage de lapins et de volailles, mettent en évidence que le niveau de consommation d'antibiotiques demeure influencé par des facteurs autres que la survenue de la maladie, comme les caractéristiques de l'élevage et les pratiques de l'éleveur (Chauvin *et al.*, 2012). Une enquête menée auprès de producteurs de dindes et de poulets a ainsi montré que 25 % des élevages environ consommaient de un tiers à deux tiers de la quantité totale d'antibiotiques

consommés par la population étudiée (106 bandes, échantillon représentatif des populations en France) (Chauvin *et al.*, 2008). L'éleveur se construit donc une probabilité subjective d'apparition de maladie, qui varie en fonction de ses compétences techniques et de son attitude vis-à-vis du risque. Le rôle joué par l'aversion vis-à-vis du risque a été mis en évidence chez les éleveurs de bovins allaitants face à un aléa climatique ou sur le prix de la viande (Mosnier, 2009). Pour sécuriser son revenu, l'éleveur ayant une forte aversion vis-à-vis du risque préférera recourir aux antibiotiques. Cette aversion peut être à l'origine d'une surconsommation d'antibiotiques, notamment par des traitements préventifs. L'aversion vis-à-vis du risque peut puiser son origine dans une sensibilité au stress ou dans des facteurs économiques : l'éleveur peut chercher à sécuriser son revenu en évitant une épidémie majeure au sein de son élevage, même si son revenu demeurera inférieur au revenu optimal (puisque la consommation d'antibiotiques sera en excès). Cette situation a par exemple été décrite dans une enquête réalisée en filière cunicole, montrant une corrélation négative entre le niveau de revenu et la consommation d'antibiotiques (Chauvin *et al.*, 2011).

Ces arbitrages sont également influencés par l'environnement technico-économique de l'élevage, pour plusieurs raisons. Premièrement, la décision de l'éleveur de médicaliser ou non entraîne des conséquences à l'échelle collective. Par exemple, la sous-consommation médicamenteuse peut être responsable d'une augmentation de la prévalence des maladies contagieuses ; en effet si le calcul privé d'un éleveur le conduit à ne pas maîtriser ces maladies, l'agent pathogène contagieux pourra se propager et affecter d'autres troupeaux. En ce sens, la sous-consommation collective peut être à l'origine d'une externalité négative (*i.e.* la dégradation de la santé et de la compétitivité du cheptel français, dégradation du bien-être des animaux). Tout d'abord, une série d'actions sanitaires pour la maîtrise des maladies contagieuses est coordonnée par les Groupements de défense sanitaire (GDS), qui peuvent inciter leurs adhérents à mettre en place des mesures faisant varier les consommations de médicaments (*e.g.* des programmes de vaccination). Puis, l'éleveur en tant que maillon de la chaîne de production de denrées alimentaires, peut voir ses choix être modérés par d'autres acteurs de la chaîne. Il peut adhérer à une filière, qui pourra tirer un avantage compétitif d'une utilisation encadrée. L'adhésion à la filière limitera les choix de l'éleveur. Par exemple, la production de produits transformés est souvent régie par un cahier des charges qui peut conduire l'éleveur à définir des stratégies sanitaires particulières (l'Agriculture Biologique et la consommation d'antibiotiques). En parallèle, il existe des éleveurs intégrés, dont la rémunération est principalement indexée sur leur compétence à produire des denrées à partir d'intrants (poussins, aliments, médicaments) fournis par l'intégrateur. Dans ce cas, il est tout à fait envisageable que la décision ou les modalités de traitement soient imposées par l'intégrateur.

Enfin, les bénéfices économiques associés à la vente de médicaments pourraient expliquer des variations de consommation, malgré les régulations de ventes au sein du système pharmaceutique, décrit dans la *figure 4*.

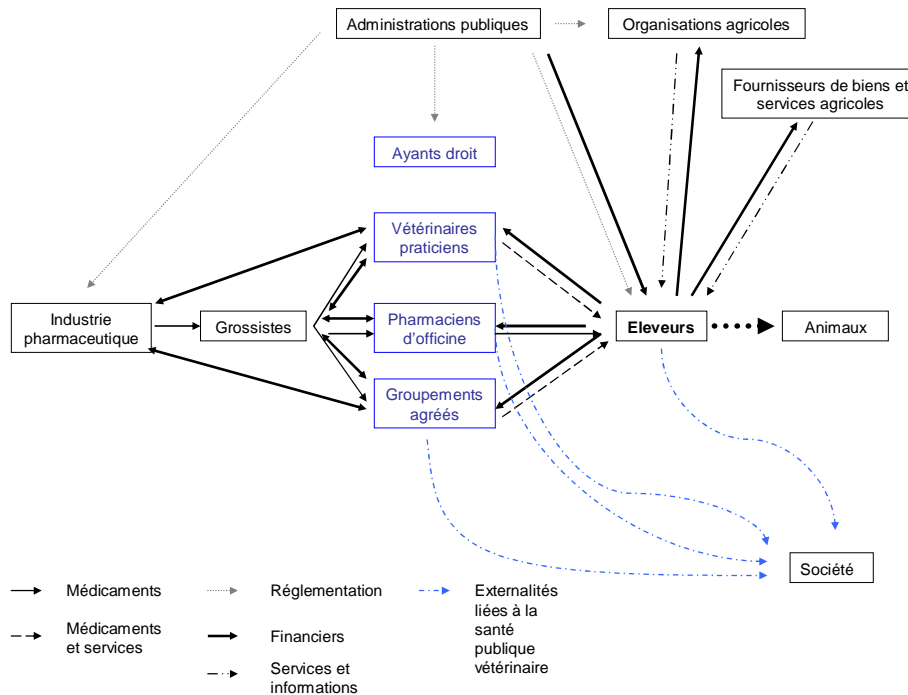


Figure 2-4: Représentation schématique du système pharmaceutique vétérinaire Source : les auteurs.

Comme pour la demande, l'offre en antibiotiques subit l'influence de différents facteurs. Les antibiotiques sont distribués *via* le système pharmaceutique vétérinaire en suivant un flux marchand industries pharmaceutiques – propriétaires d'animaux, encadré depuis la Loi du 29 mai 1975 relative à la Pharmacie vétérinaire par des réglementations sur la production, la distribution et l'utilisation du médicament vétérinaire. La prescription ne peut être réalisée que par un vétérinaire. Elle se traduit par la rédaction d'une ordonnance, obligatoire avant la délivrance de tout médicament vétérinaire. La Loi n° 75-409 du 29 mai 1975 relative à la Pharmacie vétérinaire et le Décret n° 2007-596 du 24 avril 2007 précisent les conditions et modalités de prescription et délivrance au détail des médicaments vétérinaires. Jusqu'en 2007, la prescription ne pouvait s'exercer qu'au chevet de l'animal. Le Décret n° 2007-596 a légalisé les pratiques de prescription, hors examen clinique qui peut être actuellement réalisé après rédaction d'un bilan sanitaire annuel et d'un protocole de soins qui identifie les principales maladies affectant le troupeau, et leurs modalités de traitement. La distribution au détail (ou délivrance), qui pourrait être assimilée à

l'offre *sensu stricto*, est octroyée à deux catégories d'ayants droit de plein exercice (pharmaciens titulaires d'une officine et vétérinaires praticiens), ainsi qu'à un ayant droit d'exercice restreint (groupements de producteurs à vocation économique). Depuis 2007, suite à l'arrêt Riaucourt (Guillemot, 2009), les groupements de producteurs ne sont plus autorisés à acheter et délivrer les médicaments hors Plan sanitaire d'élevage (PSE) au nom du vétérinaire même s'ils emploient un vétérinaire. Cet arrêt a conduit à la création de sociétés par les vétérinaires salariés, en marge des groupements de producteurs, autorisées à délivrer les médicaments vétérinaires hors PSE. Les éleveurs adhérents aux groupements s'approvisionnent donc aujourd'hui à deux guichets : le groupement pour les médicaments à visée préventive, le vétérinaire libéral pour les médicaments à visée curative. En réalité, les pratiques de consommation de médicaments ont peu évolué; la majorité des structures vétérinaires créées dépendent encore partiellement des groupements. À des fins de traçabilité, lors de la délivrance des médicaments soumis à ordonnance, le vétérinaire ou le pharmacien mentionne cette délivrance sur un registre sur lequel doivent être transcrites différentes informations relatives à l'identification du client, au médicament et au prescripteur. *In fine*, la position du vétérinaire, seul habilité à prescrire et autorisé à délivrer les antibiotiques, constitue une vraie singularité au sein du marché des antibiotiques. En théorie, la réglementation entourant la prescription des antibiotiques devrait garantir leurs bons usages, ceux –ci étant supervisés par le vétérinaire prescripteur, et limiter les consommations inutiles d'un point de vue médical. Mais la liberté de prescription, associée à la possibilité pour le vétérinaire de délivrer les antibiotiques, questionne les relations d'influence entre le praticien et l'éleveur.

Malgré des conditions d'accès limitées aux antibiotiques, le législateur a récemment implémenté des mesures ciblant les utilisateurs, mais aussi les prescripteurs et les dispensateurs pour réduire l'usage des antibiotiques. Si l'organisation du système pharmaceutique permet de contrôler qualitativement les flux d'antibiotiques, elle semble peiner à réguler la quantité consommée. En effet, la réglementation et ses évolutions de 1975 à 2007 devaient d'abord augmenter la traçabilité d'usage des médicaments vétérinaires, et garantir la sécurité des utilisateurs et des consommateurs. *In fine*, l'existence de ce système pourrait constituer un outil puissant, mobilisable pour réduire les consommations d'antibiotiques, mais ne semble pas pouvoir en l'état limiter les demandes des éleveurs. Pour le régulateur, l'enjeu consiste donc à mettre en place des mesures équilibrées concernant l'usage des antibiotiques. Cet équilibre s'avère nécessaire car paradoxalement la sous- ou sur-consommation d'antibiotiques peut influencer sur la santé animale et sur la santé publique. Le risque sanitaire lié à l'antibiorésistance constitue une externalité négative qui justifie l'intervention des pouvoirs publics, qui mettent actuellement en place des leviers de maîtrise à l'aide d'approches réglementaire (LAA) et volontaire (Plan Ecoantibio). Le modèle conceptuel proposé dans la *figure*

Il précise les facteurs influençant l'usage des antibiotiques et les leviers de réduction associés. Les leviers institutionnels et économiques implémentés par les pouvoirs publics français sont l'objet d'étude de la section suivante.

2.5 Pertinence des mesures récentes visant à réduire l'usage des antibiotiques en élevage

L'existence de facteurs influençant la consommation des antibiotiques au niveau de l'offre et de la demande a conduit le régulateur à mettre en place des mesures spécifiques. Cette section discute la pertinence des mesures en respectant cette dichotomie.

2.5.1 Mesures ciblant la demande

Les objectifs du Plan Ecoantibio et de l'article 49 de la LAA visent à réduire drastiquement l'usage des antibiotiques. À ce titre, le texte législatif stipule que « *les bonnes pratiques d'élevage et les bonnes pratiques de prescription et d'utilisation de ces substances sont privilégiées* ».

Six mesures de l'Axe 1 du Plan Ecoantibio (« *Promouvoir les bonnes pratiques et sensibiliser les acteurs aux risques liés à l'antibiorésistance et à la nécessité de préserver l'efficacité des antibiotiques* ») ciblent spécifiquement l'augmentation de compétences des éleveurs. Une mesure de l'Axe 3 (« *Renforcer l'encadrement et réduire les pratiques à risque* ») évoque la nécessité d'amélioration de la conduite d'élevage pour réduire les consommations d'antibiotiques.

La survenue de l'évènement sanitaire – ou son anticipation – est conditionnée par une conjonction de facteurs exogènes et endogènes défavorables. Bien que l'accès aux antibiotiques soit régulé, la mise en œuvre des traitements en l'élevage relève de l'initiative de l'éleveur. L'éleveur est en effet le décideur, mais également l'infirmier de ses animaux, et dispose d'une pharmacie qu'il peut utiliser, sous réserve de satisfaire à certaines exigences réglementaires. À ce titre, la mise en place de leviers visant à réduire la demande d'antibiotiques apparaît justifiée. La présente section discute de la portée de mesures visant à réduire la demande d'antibiotiques.

2.5.1.1 Réduire la consommation d'antibiotiques en augmentant les compétences individuelles des éleveurs

L'augmentation du degré de technicité des éleveurs constitue un levier indirect dans la réduction de consommation des antibiotiques, dans la mesure où elle peut permettre une réduction des usages non rationnels. Cette augmentation peut se faire selon deux modalités : un transfert technique de

proximité d'une part, des actions coordonnées d'autre part. Ces deux modalités reposent sur le fait que l'élevage ne constitue pas une entité isolée, mais une structure en relation permanente avec des organismes divers – publics ou privés – qui jouent un rôle dans la prise en charge sanitaire (Chilonda, 2001 ; Raboisson *et al.*, 2012). Dans le cas particulier des antibiotiques, l'encadrement technique fourni par le vétérinaire prescripteur va influencer sur leur usage (Kaneene et Miller, 1992). D'autres acteurs (techniciens, inséminateurs, nutritionnistes...), entretenant des relations privilégiées avec l'éleveur, peuvent également intervenir dans le processus de décision, voire même prendre directement cette décision. Indépendamment des vecteurs d'informations, l'éducation des éleveurs en matière de bon usage des antibiotiques pourrait permettre de rationaliser les traitements.

Dans certains cas, les institutions peuvent être les moteurs d'actions collectives, dont l'objectif est de coordonner les actions individuelles des producteurs afin de répondre à une problématique collective (Ostrom, 1990). En médecine humaine par exemple, des actions collectives de sensibilisation des consommateurs, *via* des campagnes de communication coordonnées par les pouvoirs publics (slogans du type « *Les antibiotiques, c'est pas automatique* ») ont permis une diminution des volumes d'antibiotiques consommés (Sabuncu *et al.*, 2009). L'éducation des praticiens en petits groupes, animés par un expert, débouche également sur une diminution significative des consommations de médicaments (Madrdejós-Mora *et al.*, 2004; Ranji *et al.*, 2008). *A contrario*, la rédaction de guides de bonnes pratiques largement diffusés, dont l'objectif est de rappeler les bons et mauvais usages des antibiotiques, semble produire des résultats moins tangibles (Al-Momany *et al.*, 2009 ; Faryna *et al.*, 1987).

L'impact d'actions collectives concernant la consommation d'antibiotiques demeure mal connu en productions animales. Historiquement, la lutte contre les maladies infectieuses reste basée sur l'adhésion des éleveurs aux programmes de prophylaxie coordonnés par les GDS. L'adhésion des éleveurs aux GDS, avant tout mue par des intérêts individuels (diminution de l'incidence de maladie), a néanmoins deux répercussions collectives concernant la réduction d'usage d'antibiotiques. Elle permet d'une part de modifier le contexte épidémiologique et *in fine* la consommation d'antibiotiques (Rat-Aspert et Fourichon, 2010). Elle permet également de délivrer un message standardisé à tous les adhérents sur le bon usage des antibiotiques, par exemple à travers des programmes de formations du type « éleveur-infirmier ». La contribution d'actions volontaires coordonnées à la diminution de consommation d'antibiotiques en élevage, théoriquement bénéfique, reste encore à documenter.

2.5.1.2 Réduire la consommation d'antibiotiques en substituant d'autres facteurs de production

Il existe, au sein d'un système d'élevage donné, un niveau basal de maladies, qui peut être qualifié de « norme sanitaire » (Raboisson *et al.*, 2012), et qui conduit à définir un niveau normé de consommation d'antibiotiques. Cette norme sanitaire est associée à des facteurs (déjà discutés dans la section 1), sur lesquels l'éleveur ne peut pas influencer.

Les déterminants de la consommation qui nous préoccupent ici sont les facteurs endogènes, dans la mesure où une meilleure maîtrise de ces derniers par l'éleveur est de nature à faire varier le niveau de consommation d'antibiotiques dans l'exploitation. La majorité des facteurs de risque recensés constitue des facteurs de production. Se pose alors la question de la substituabilité entre ces différents facteurs endogènes. Est-il par exemple possible d'atteindre un même niveau de production en utilisant des niveaux différents d'inputs? Un exemple courant de substitution est le recours à la prophylaxie médicale (vaccination, antibioprévention) pour diminuer un risque de maladie lors de mauvaises conditions d'élevage.

La relation de substitution entre facteurs de production s'envisage facilement entre ressources sanitaires préventives et facteurs de production non sanitaires (alimentation, logement), sans *a priori* sur la nature parfaite ou non parfaite de la relation (plus d'unités d'un facteur employées pour compenser le manque d'un autre). Elle s'envisage aussi aisément entre différents types de ressources sanitaires préventives (vaccin A ou vaccin B ou antibioprévention). Des substitutions entre inputs médicamenteux préventifs et inputs curatifs sont également possibles, comme l'illustre l'intérêt de la vaccination pour diminuer le nombre de traitements curatifs des maladies respiratoires des jeunes bovins (Assié *et al.*, 2009b). La maîtrise des facteurs de risque endogènes impacte donc qualitativement (sévérité) et quantitativement (incidence, contagiosité) la maladie, et *in fine* les consommations d'antibiotiques. Cette relation a également été mise en évidence en production porcine, dans une enquête rapportant de plus faibles consommations antibiotiques dans les élevages mettant en place des mesures de biosécurité (Laanen *et al.*, 2013). La substitution entre inputs médicamenteux et autres inputs est possible mais nécessite une anticipation de l'évènement sanitaire. En cas d'apparition de troubles sanitaires, la demande de traitement curatif devient rigide. Dans ce cas, le niveau de consommation des autres facteurs ne varie que faiblement. L'anticipation repose en partie sur les compétences individuelles des éleveurs, et leur capacité (financières, logistiques...) à mettre en place des substitutions.

2.5.1.3 Réduire la consommation d'antibiotiques en faisant varier les prix

Lorsqu'une substitution est possible, la question de son intérêt économique demeure. Les difficultés d'estimation de l'intérêt économique de mesures zootechniques, la volatilité des prix des produits et des facteurs de production, constituent autant d'incertitudes qui viennent limiter les alternatives non médicales aux antibiotiques à court terme, même si elles semblent socialement pertinentes compte tenu des externalités liées à l'usage des antibiotiques en élevage. La substituabilité entre facteurs de production favorise le recours à des inputs à retour sur investissement rapide tels que les antibiotiques, dont l'efficacité est garantie dans des conditions d'utilisation standard et limite l'incertitude sur le revenu agricole. En outre, les antibiotiques assurent un contrôle de dommage à court terme, tandis que beaucoup d'autres facteurs l'assurent à long et moyen termes.

En raison des contraintes budgétaires propres à toute exploitation agricole, les ressources monétaires sont allouées aux stratégies de maîtrise de la maladie caractérisées par la rentabilité la plus élevée. Cette contrainte budgétaire peut limiter l'éleveur dans le choix de certains investissements coûteux (mais pouvant néanmoins s'avérer rentables à long terme, comme la réfection d'un bâtiment) et rigidifier encore un peu plus la demande en antibiotique. Enfin, la contrainte budgétaire conduit l'éleveur à favoriser des investissements caractérisés par une probabilité élevée de retour sur investissement. Si les antibiotiques n'assurent aucun retour sur investissement en l'absence de maladies à venir, leur efficacité autorise un niveau de maîtrise de la maladie très satisfaisant en cas de survenue, et le recours aux antibiotiques est aisé techniquement. *In fine*, les antibiotiques s'avèrent de puissants outils de contrôle de dommages, fortement résistants à la contrainte budgétaire.

2.5.2 Mesures visant l'offre des antibiotiques

La décision du législateur de mettre en place des mesures incitatives, mais également coercitives ciblant directement les prescripteurs et les ayants droit, matérialise la volonté des pouvoirs publics de maîtriser de possibles dérives au sein même du système de distribution du médicament vétérinaire. Quatorze mesures du Plan Ecoantibio ciblent les vétérinaires, dont une majorité est également inscrite dans la LAA. Les mesures réglementaires majeures sont étudiées dans cette sous-section.

2.5.2.1 Réduire les usages en encadrant la prescription des antibiotiques

L'objectif global de réduction de 25 % de l'usage de l'ensemble des antibiotiques, fixé par le Plan Ecoantibio, est réaffirmé par la LAA, qui prévoit une réduction de 25 % entre 2013 et 2016 de l'usage des fluoroquinolones et céphalosporines de 3^e et 4^e générations. La fixation d'un objectif global, identique pour toutes les espèces animales concernées, laisse perplexe quant à son applicabilité. Certaines filières (principalement d'élevage intensif), fortement consommatrices d'antibiotiques, peuvent contribuer fortement à la réalisation de cet objectif, alors même que des filières de production plus extensives ne disposeront que de peu de leviers de réduction de leurs consommations d'antibiotiques. Enfin, l'impact sur l'antibiorésistance de telles réductions d'usage demeure encore à évaluer.

Un décret en cours d'élaboration, correspondant à la mesure 26 du Plan Ecoantibio, prévoit en outre un encadrement strict de la prescription des antibiotiques d'importance critique. S'il est aisément possible d'imaginer que ces mesures contraignantes vont limiter la consommation des familles d'antibiotiques ciblées, leur impact concernant les mésusages ou les surconsommations demeure incertain. En effet, pour une affection donnée, il est probable qu'une famille d'antibiotique soit substituée à une autre, ce qui au final (i) n'entraînera pas de baisses réelles d'usage, et (ii) n'aura que peu d'effet sur l'externalité (antibiorésistance), du fait de l'existence de résistances croisées entre les différentes familles d'antibiotiques (Carattoli, 2009).

2.5.2.2 Réduire les usages en encadrant les pratiques commerciales associées aux antibiotiques

L'aménagement de mesures visant à restreindre les incitations à la prescription ou à la délivrance à tous les étages du système pharmaceutique, recommandé en France par le Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces (CGAAER) (Dahan, 2013), apparaît aujourd'hui dans l'article 48 de la LAA. Les mesures préconisées visent à mieux réguler les relations financières, directes ou indirectes, entre les fabricants de médicaments et les ayants droit.

La loi prévoit d'abord l'interdiction du versement d'avantages en nature (matériels, voyages...) aux ayants droit, mais également aux sociétés les représentant ainsi qu'aux étudiants vétérinaires. Elle prévoit également des mesures visant à interdire toute possibilité d'incitation à l'achat d'antibiotiques par le biais de remises « croisées³ » sur d'autres catégories de médicaments. La réglementation vise également à interdire la conclusion de contrats de coopération commerciale

³ L'ayant droit toucherait alors la remise initialement reliée à l'achat d'antibiotiques en cas d'achat d'un autre médicament non antibiotique.

concernant la vente d'antibiotiques. Enfin, la Loi prévoit l'interdiction de toute forme de remises, rabais ou ristournes⁴ octroyées lors de l'achat d'antibiotiques (toutes familles d'antibiotiques confondues). L'interdiction de remises sur toutes les familles d'antibiotiques présente d'un point de vue théorique l'intérêt de limiter les incitations à la prescription, mais également de décourager les substitutions entre familles d'antibiotiques (à la différence de mesures spécifiques à certaines molécules). Toutefois, le dispositif législatif présuppose que les remises associées à la vente d'antibiotiques influent sur le prix de vente facturé à l'éleveur, ce qui reste dans les faits à établir. Dans l'hypothèse où les remises ne sont pas – ou peu – répercutées sur le prix final, il est peu probable que cette mesure influence réellement le prix réel de vente des antibiotiques appliqué aux éleveurs. Le degré de réintégration des remises dans le prix de vente au consommateur varie fortement en fonction des filières de production considérées. Par ailleurs, l'encadrement des marges des intermédiaires présuppose que le vétérinaire soit en mesure de persuader l'éleveur d'utiliser des antibiotiques au-delà de son optimum de profit. Cette hypothèse reste également à vérifier.

La LAA prévoit enfin l'interdiction de conditions particulières de ventes, c'est-à-dire que le vendeur (l'industrie pharmaceutique et les ayants droit) devra afficher un prix unique, valable pour l'ensemble de ses clients. Cette interdiction semble théoriquement opportune, car elle permettrait de pénaliser les gros consommateurs d'antibiotiques, qui bénéficieraient de tarifs préférentiels. Néanmoins, cette mesure ne règle pas totalement la question de la concurrence entre ayants droit, cette dernière pouvant conduire à terme à une chute du prix des antibiotiques (la marge reste librement fixée par l'ayant droit), qui s'accompagnerait une augmentation des volumes commercialisés.

Finalement, l'ensemble de ces mesures législatives ne règle donc pas totalement la question fondamentale de la fixation du prix de vente. Il n'existe à ce jour pas de données permettant d'évaluer la pertinence des mesures évoquées ci-dessus. La mise en place de taxes et l'administration du prix de vente des antibiotiques constituent deux alternatives étonnamment peu étudiées. Un système de taxe pigovienne (Pigou, 1920) pourrait permettre d'internaliser l'externalité (antibiorésistance). Une telle taxe est théoriquement égale au dommage des effets externes provoqués par l'utilisation d'une unité supplémentaire d'antibiotique. Il est possible que la taxe pigovienne n'ait qu'un effet limité sur la réduction de la consommation d'antibiotiques, car leur demande en productions animales est probablement rigide ; en revanche, elle permettrait de

⁴ Les remises (ou remises arrière ou marges arrière) sont des rémunérations versées sous différentes formes par les fournisseurs aux ayants droit avec lesquels ils concluent des accords commerciaux.

maximiser l'utilité de la consommation. Sa mise en place nécessite néanmoins une évaluation préalable des dommages, ce qui s'avère complexe dans le cas de l'antibiorésistance. Une alternative consisterait à fixer une taxe sur les antibiotiques, dont le montant pourrait être fixé en fonction des coûts de développements supportés par les industries pharmaceutiques (Vagsholm et Hojgard, 2010). La taxe, supportée soit par les industriels, soit par les consommateurs, pourrait être redistribuée pour encourager la recherche en antibiologie. Une administration du prix des antibiotiques, destinée à maintenir les prix pratiqués à un niveau élevé, adresserait au marché un signal équivalent.

2.5.2.3 Réduire les usages en réduisant la dépendance économique des vétérinaires aux ventes d'antibiotiques

La délivrance au détail se répartit de manière relativement inégale entre les ayants droit, l'essentiel des volumes d'antibiotiques (environ 80 %) étant délivré par les vétérinaires. La relation marchande entre le prescripteur-délivreur (le vétérinaire) et ses clients (les éleveurs) soulève la question du conflit d'intérêts. Le vétérinaire pourrait en effet être incité à accroître ses prescriptions de médicaments, de manière à augmenter le profit retiré de son activité commerciale d'ayant droit. La simultanéité d'exercice de la prescription et de la délivrance des antibiotiques par le vétérinaire pourrait ainsi engendrer une situation propice à la surconsommation d'antibiotiques. Le découplage prescription-délivrance des antibiotiques a été repoussé en France, bien qu'il soit en vigueur dans d'autres pays de l'Union européenne (Rosbach, 2012). Ce découplage semble produire des résultats controversés (Dahan, 2013). Il permet bien de solutionner la problématique du conflit d'intérêts, mais la dépendance financière des prescripteurs vis-à-vis des éleveurs pourrait conduire, dans un marché concurrentiel de l'offre médicale, les vétérinaires à la prescription de « complaisance ». La menace de découplage qui a pesé durant le travail législatif pourrait avoir joué positivement sur la réduction de consommation d'antibiotiques. Une évaluation économique de l'intérêt de cette mesure pourrait s'avérer intéressante à la lumière de la non-atteinte des objectifs de réduction. L'investissement des vétérinaires dans des stratégies visant à diversifier leurs sources de revenus, telles que la vente de services, pourrait être un témoin intéressant de leur dépendance financière à la vente d'antibiotiques, et éclairer la réalité du conflit d'intérêts.

Au-delà de la dualité d'exercice du vétérinaire, à la fois prescripteur et dispensateur d'antibiotiques, la relation client-fournisseur qui lie l'éleveur et le vétérinaire mériterait d'être questionnée au regard de la consommation d'antibiotiques. En médecine humaine, la relation marchande liant le prescripteur et le patient, et la volonté de ne pas s'écarter de la pratique

dominante constituent deux facteurs explicatifs de recours non justifié aux antibiotiques (Rosman, 2010). La préférence de certains praticiens pour des médicaments avec « effet de démonstration », afin que les patients aient l'impression d'avoir « réellement reçu des soins » a également été observée (Orzech et Nichter, 2008). La pression exercée par les patients sur le médecin pour orienter la prescription d'antibiotiques a également été décrite (Avorn et Solomon, 2000 ; Orzech et Nichter, 2008). Il est vraisemblable que de tels phénomènes existent en médecine vétérinaire. En agriculture s'ajoute le risque économique associé à la non-utilisation d'antibiotiques, qui peut conduire à une surmédicalisation des animaux : l'utilisation d'antibiotiques pourrait jouer un effet d'assurance, en diminuant le risque d'échec thérapeutique, lié à des difficultés de diagnostic. Les pressions possiblement exercées par les éleveurs pour avoir accès aux antibiotiques n'ont à notre connaissance pas fait l'objet d'études à ce jour, et aucun dispositif réglementaire actuel ne semble les considérer.

2.6 Conclusion

L'activation de leviers (incitations, réglementation) permettant de substituer des mesures préventives aux antibiotiques peut présenter un intérêt, dans la mesure où le coût des alternatives est inférieur à celui des antibiotiques, car elle permet d'améliorer la compétitivité des élevages et de réduire la consommation d'antibiotiques. Deux types d'approches, complémentaires, ressortent de l'analyse proposée. Les approches réglementaires ont pour objectif de contraindre l'utilisation des antibiotiques, et de limiter l'influence des pratiques commerciales sur leur consommation. Ce type de mesures ne considère pas la question de la nécessité d'usage comme centrale, mais poursuit l'objectif de limiter l'usage et les incitations à l'usage, toutes choses égales par ailleurs. Si l'efficacité de telles mesures à court terme peut s'avérer importante, il convient néanmoins d'évaluer les possibilités de contournement. Les approches volontaires regroupent à la fois des initiatives privées et payantes (l'éleveur finance l'augmentation de son niveau de compétences sanitaires) et des initiatives collectives (adhésion à un groupement ou engagement dans un cahier des charges). Même si leurs effets restent plus difficiles à mesurer, ces approches présentent l'avantage de sensibiliser les parties prenantes à la problématique (particulièrement les éleveurs) qui peuvent internaliser l'externalité dans leur processus de prise de décision. Dans le cas de l'utilisation des antibiotiques, toutes les initiatives permettant de réduire l'incidence des maladies sont vertueuses, car elles permettent d'augmenter la compétitivité des élevages, en diminuant les consommations antibiotiques.

La réduction de l'usage des antibiotiques, à travers les différents outils présentés dans cet article, poursuit un objectif de lutte contre l'antibiorésistance. Parmi tous les dispositifs de lutte contre l'antibiorésistance mis en œuvre ou envisagés par les autorités sanitaires, on peut s'étonner de l'absence de réflexions sur l'administration des prix et de dispositifs s'inspirant de la taxe pigovienne. Si l'antibiorésistance constitue une réalité, la mesure des dommages qu'elle entraîne doit être menée prioritairement. Comme ces dommages sont décalés dans le temps, un consensus d'experts et de citoyens doit être recherché concernant les hypothèses de calcul, en particulier concernant le taux d'actualisation des dommages futurs. Simultanément, les déterminants de l'antibiorésistance se doivent d'être mieux investigués, en évaluant l'ensemble des stratégies de traitements possibles (*e.g.* curatif vs préventif ; faible ou forte posologie ; choix d'un antibiotique critique ou non). Ces diverses connaissances demeurent nécessaires pour éclairer la prise de décision publique. Le Plan Ecoantibio fournit un objectif indicatif de réduction de 25 % des consommations d'antibiotiques. Il est principalement un signal destiné à mettre en avant l'importance de cette question, mais sa portée sur les choix individuels demeure limitée. Les mesures de persuasion et de formation sont nécessaires à une réduction des consommations d'antibiotiques. Elles ne sont pas toutefois suffisantes tant que la dernière unité consommée apparaît rentable au décideur. Inversement, une internalisation de l'externalité par une taxe constitue également une incitation pour les usagers à acquérir les compétences pour s'adapter à cette taxe en baissant sa consommation au moindre coût.

2.7 Références bibliographiques

- Al-Momany N. H., Al-Bakri A. G., Makahleh Z. M., Wazaify M. M. (2009). Adherence to international antimicrobial prophylaxis guidelines in cardiac surgery: a Jordanian study demonstrates need for quality improvement. *Journal of Managed Care Pharmacy*, n°15, pp. 262-271.
- Angulo F. J., Baker N. L., Olsen S. J., Anderson A., Barrett T. J. (2004). Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Seminar in Pediatric Infectious Diseases* n°15, pp. 78-85.
- Assie S., Bareille N., Beaudreau F., Seegers H. (2009a). Management- and housing-related risk factors of respiratory disorders in non-weaned French Charolais calves. *Preventive Veterinary Medicine*, n°91, pp. 218-225.
- Assie S., Seegers H., Makoschey B., Desire-Bousquie L., Bareille N. (2009b). Exposure to pathogens and incidence of respiratory disease in young bulls on their arrival at fattening operations in France. *Veterinary Record*, n°165, pp. 195-199.
- Avorn J., Solomon D. H. (2000). Cultural and economic factors that (mis)shape antibiotic use: the nonpharmacologic basis of therapeutics. *Annals of Internal Medicine*, n°133, pp. 128-135.
- Bentley R., Bennett J. W. (2003). What is an antibiotic? Revisited. *Advances in Applied Microbiology*, n°52, pp. 303-331.
- Berry D. P., Bermingham M. L., Good M., More S. J. (2011). Genetics of animal health and disease in cattle. *Irish Veterinary Journal*, n°64, p. 5.
- Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, n°53, pp. 2227-2238.
- Cernicchiaro N., Renter D. G., White B. J., Babcock A. H., Fox J. T. (2012). Associations between weather conditions during the first 45 days after feedlot arrival and daily respiratory disease risks in autumn-placed feeder cattle in the United States. *Journal of Animal Science*, n°90, pp. 1328-1337.
- Chauvin C., Croisier A., Tazani F., Balaine L., Eono F., Salaun-Huneau A., Le Bouquin S., (2011). Utilisation des antibiotiques en filière cunicole : Enquête en élevages 2009-2010. *Journées de la Recherche Cunicole*, 22-23 novembre 2011, Le Mans.

- Chauvin C., Le Bouquin S., Sanders P. (2012). Usage des antibiotiques en filières porcine, avicole et cunicole en France. Résultats d'enquêtes. *Bulletin épidémiologique santé animale - alimentation*, pp. 12-15.
- Chauvin C., Querrec M., Perot A., Guillemot D., Sanders P. (2008). Impact of antimicrobial drug usage measures on the identification of heavy users, patterns of usage of the different antimicrobial classes and time-trends evolution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, n°31, pp. 301-311.
- Chevance A., Moulin G. (2009). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2008. *Fougères, AFSSA, rapport annuel*, 44 p.
- Chevance A., Moulin G. (2012). *Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2011*. Paris, Anses, rapport annuel, 72 p.
- Chi J., Weersink A., VanLeeuwen J. A., Keefe G. P. (2002). The Economics of Controlling Infectious Diseases on Dairy Farms. *Canadian Journal of Agricultural Economics/Revue canadienne d'agroeconomie*, n°50, pp. 237-256.
- Chilonda P., Van Huylenbroeck G. (2001). A conceptual framework for the economic analysis of factors influencing decision-making of small-scale farmers in animal health management. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, n°20, pp. 687-700.
- Dahan M. (2013). *Encadrement des pratiques commerciales pouvant influencer la prescription des antibiotiques vétérinaires*. Rapport du Conseil général de l'agriculture, de l'alimentation et des espaces ruraux, 123 p.
- European Union (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union*, 15 p.
- Faryna A., Wergowske G. L., Goldenberg K. (1987). Impact of therapeutic guidelines on antibiotic use by residents in primary care clinics. *Journal of General Internal Medicine*, n°2, pp. 102-107.
- Guillemot P., Vandaële E. (2009). L'arrêt Riaucourt et ses effets. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, n°162, pp. 171-180.

- Kaneene J. B., Miller R. (1992). Description and evaluation of the influence of veterinary presence on the use of antibiotics and sulfonamides in dairy herds. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, n°201, pp. 68-76.
- Kristensen E., Jakobsen E. B. (2011). Challenging the myth of the irrational dairy farmer; understanding decision-making related to herd health. *New Zealand Veterinary Journal*, n°59, pp. 1-7.
- Laanen M., Persoons D., Ribbens S., de Jong E., Callen B., Strubbe M., Maes D., Dewulf J. (2013). Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *Veterinary Journal.*, n°198, pp. 508-512.
- Lemery B., Ingrand S., Dedieu B., Dégrange B. (2005). Agir en situation d'incertitude : le cas des éleveurs de bovins allaitants. *Economie rurale*, n°288, pp. 57-69.
- Lhermie G. (2010). *Demande de médicaments en productions animales*. Montpellier, Faculté de sciences économiques, mémoire de fin d'études, 90 p.
- Madridejos-Mora R., Amado-Guirado E., Perez-Rodriguez M. T. (2004). Effectiveness of the combination of feedback and educational recommendations for improving drug prescription in general practice. *Medical Care*, n°42, pp. 643-648.
- McInerney J. (1996). Old economics for new problems - livestock disease: presidential address. *Journal of Agricultural Economics*, n°47, pp. 295-314.
- McInerney J. P., Howe K. S., Schepers J. A. (1992). A framework for the economic analysis of disease in farm livestock. *Preventive Veterinary Medicine*, n°13, pp. 137-154.
- Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation de la Pêche et de la Ruralité (2011). *Plan National De Réduction des Risques d'Antibiorésistance en Médecine Vétérinaire ECOANTIBIO 2017*. Document de synthèse, 32 p.
- Mosnier C. (2009). *Adaptation of suckler cow farms to weather and beef price risks: modelling approaches*. Paris, Agroparis-Tech, thèse de doctorat d'économie, 182 p.
- Moulin G., Cavalie P., Pellanne I., Chevance A., Laval A., Millemann Y., Colin P., Chauvin C. (2008). A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, n°62, pp. 617-625.

- Orzech K. M., Nichter M. (2008). From Resilience to Resistance: Political Ecological Lessons from Antibiotic and Pesticide Resistance. *Annual Review of Anthropology*, n°37, pp. 267-282.
- Ostrom E. (1990). *Governing the Commons: The Evolution of Institutions for Collective Action*. Cambridge University Press, 60 p.
- Pigou A. (1920). *The economics of welfare*. (1932). London, Edition. McMillan&Co.
- Raboisson D., Derville M., Herman N., Cahuzac E., Sans P., Allaire G. (2012). Herd-level and territorial-level factors influencing average herd somatic cell count in France in 2005 and 2006. *Journal of Dairy Research*, n°79, pp. 324-332.
- Ranji S. R., Steinman M. A., Shojania K. G., Gonzales R. (2008). Interventions to reduce unnecessary antibiotic prescribing: a systematic review and quantitative analysis. *Medical Care* n°46, pp. 847-862.
- Rat-Aspert O., Fourichon C. (2010). Modelling collective effectiveness of voluntary vaccination with and without incentives. *Preventive Veterinary Medicine*, n°93, pp. 265-275.
- Rosbach A. (2012). *On the Microbial Challenge – Rising threats from Antimicrobial Resistance* European Parliament. Report, 24 p.
- Rosman S. (2010). Les pratiques de prescription des antibiotiques en médecine générale en France et aux Pays-Bas. *Revue Sociologie Santé n° spécial Médicaments et Société*, n°30, pp. 81-99.
- Sabuncu E., David J., Bernede-Bauduin C., Pepin S., Leroy M., Boelle P. Y., Watier L., Guillemot D. (2009). Significant reduction of antibiotic use in the community after a nationwide campaign in France, 2002-2007. *PLOS Medicine*, n°6, pp. 2-9.
- Singer R. S., Finch R., Wegener H. C., Bywater R., Walters J., Lipsitch M. (2003). Antibiotic resistance--the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis*, n°3, pp. 47-51.
- Snowder G. D., Van Vleck L. D., Cundiff L. V., Bennett G. L. (2006). Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *Journal of Animal Science*, n°84, pp. 1999-2008.

- Spears J. W., Weiss W. P. (2008). Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Veterinary Journal*, n°176, pp. 70-76.
- Swinkels J. M., Hogeveen H., Zadoks R. N. (2005). A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Science*, n°88, pp. 4273-4287.
- Tisdell C. (1995). Assessing the Approach to Cost-Benefit Analysis of Controlling Livestock Diseases of McInerney and Others. Ed. University of Queensland, Research Papers and Reports, *Animal Health Economics*, n°3, Economics, 22 p.
- Vagsholm I., Hojgard S. (2010). Antimicrobial sensitivity-A natural resource to be protected by a Pigouvian tax? *Preventive Veterinary Medicine*, n°96, pp. 9-18.
- Wang H., McEntire J. C., Zhang L., Li X., Doyle M. (2012). The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Revue Scientifique et Technique*, n°31, pp. 249-260.

3. CHAPITRE 3. DIFFERENCE D'ACTIVITE IN VITRO ET IN VIVO D'UNE FLUOROQUINOLONE SUR DEUX ESPECES BACTERIENNES DE LA FAMILLE DES *PASTEURELLACEAE* DE CMI SIMILAIRES. CONSÉQUENCES SUR LES DOSES EFFICACES

Etude expérimentale n°1: **Bacterial species-specific activity of a fluoroquinolone against two closely related *Pasteurellaceae* with similar MICs. Differential *in vitro* inoculum effects and *in vivo* efficacies.**

from G. Lhermie, F. El Garch, PL. Toutain, AA. Ferran, And A. Bousquet-Melou

Accepté pour publication au journal PLOS ONE le 8 octobre 2015

3.1 Résumé en français

Nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* l'activité de la marbofloxacin sur deux souches bactériennes appartenant aux espèces *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*, membres de la famille des *Pasteurellaceae* et agents des bronchopneumonies infectieuses (BPI) chez les bovins. Les deux souches utilisées avaient des CMI proches. *In vitro*, les relations entre les concentrations et l'activité de la marbofloxacin ont été évaluées en présence d'inocula bactériens de tailles différentes (10^5 et 10^9 UFC/mL) en réalisant des courbes de bactéricidie. Les concentrations en marbofloxacin au contact de la suspension bactérienne étaient constantes pendant toute la durée de l'incubation. Les courbes de bactéricidie ont été modélisées afin d'établir des relations concentration-effet de la marbofloxacin pour chaque souche et chaque taille d'inoculum.

Pour l'inoculum de plus faible taille, la marbofloxacin a montré une activité similaire sur les deux souches bactériennes, avec des concentrations capables de réduire l'inoculum de 3 log ($EC_{-3\log}$) proches de la CMI pour chaque souche. Pour les inocula de grande taille, l'activité de la marbofloxacin a montré des différences marquées entre les deux souches. Pour *Pasteurella multocida*, l'activité contre le gros inoculum a été fortement diminuée, attestant de la présence d'un « effet inoculum » qui est abondamment décrit dans la littérature et que nous avons déjà observé avec la marbofloxacin contre *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Étonnement, nous n'avons pas observé d'« effet inoculum » pour *Mannheimia haemolytica*, l'activité de la marbofloxacin se révélant similaire entre le gros et le petit inoculum. Au final, face à un gros inoculum bactérien, la marbofloxacin a été beaucoup plus active contre *Mannheimia haemolytica* que contre *Pasteurella multocida*, avec un rapport de 10 entre les concentrations efficaces (concentrations capables de réduire l'inoculum de 5 log, $EC_{-5\log}$), exprimées en multiple des CMI.

Nous avons également étudié l'activité de la marbofloxacin dans un modèle d'infection pulmonaire chez la souris immunodéprimée. Les souris ont été infectées avec des inocula de 10^9 CFU des mêmes souches de *Mannheimia haemolytica* ou *Pasteurella multocida*. Compte-tenu de la faible virulence de ces deux espèces bactériennes chez la souris, nous n'avons pas pu obtenir d'infection pulmonaire avec des inocula bactériens de petite taille. À la dose de 40 mg/kg, l'efficacité clinique et bactériologique de la marbofloxacin a été très supérieure chez les souris infectées avec *Mannheimia haemolytica* que chez les souris infectées avec *Pasteurella multocida*. Des groupes de souris infectées avec *Mannheimia haemolytica* ont également été traitées avec des doses de marbofloxacin de 1, 5, 10 et 20 mg/kg. La relation dose-effet établie a montré à partir

de la dose de 5 mg/kg (et pour les doses supérieures) des résultats cliniques et bactériologiques supérieurs à ceux obtenus avec 40 mg/kg contre *Pasteurella multocida*.

Au final, la marbofloxacin manifeste une activité antimicrobienne supérieure contre *Mannheimia haemolytica* par rapport à *Pasteurella multocida*, deux espèces bactériennes très proches phylogénétiquement et responsables de BPI chez les bovins. Les données *in vitro* suggèrent que cet effet pourrait être en lien avec une absence d'« effet inoculum » pour *Mannheimia haemolytica*, la marbofloxacin étant aussi active contre un gros inoculum que contre un faible inoculum de cette espèce bactérienne. La très grande efficacité de la marbofloxacin contre *Mannheimia haemolytica* associée à l'existence d'un « effet inoculum » avec *Pasteurella multocida* suggère qu'une stratégie de traitement précoce avec des doses plus faibles (adaptées aux petits inocula) que les doses recommandées actuellement (établies pour le traitement d'infection sévères) pourrait être envisagée dans le traitement des BPI chez les bovins.

3.2 Abstract

We investigated the antimicrobial activity of a fluoroquinolone against two bacterial species belonging to the *Pasteurellaceae* family that were genetically close and had similar MICs. Time-kill experiments were used to measure the *in vitro* activity of marbofloxacin against two strains of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* with close MICs. We observed that marbofloxacin potency was higher against *M. haemolytica* than *P. multocida*, ie a lower concentration of marbofloxacin was required to obtain the same bactericidal effect. For both bacterial species, the antimicrobial activity was decreased with increasing the inoculum size. However, this inoculum effect was lower with *M. haemolytica* than with *P. multocida*. In addition, we used a pulmonary infection model with immunocompromised mice intratracheally infected with 10^9 CFU of bacteria and treated with different marbofloxacin doses. At the same dose, the clinical and bacteriological outcomes were much better for mice infected with *M. haemolytica* than for those infected with *P. multocida*. Moreover, the bacteriological eradication was obtained with a lower marbofloxacin dose for the mice infected with *M. haemolytica*. Our results suggest that the differential *in vivo* marbofloxacin efficacy observed with the two bacterial species of similar MIC could be explained by a differential inoculum effect. As a consequence, MICs determined under standard conditions on 10^5 CFU inocula do not appear to be adapted to predict antibiotic efficacy, at least with high inocula, even with closely related bacterial strains. In the field, adjusting the antimicrobial doses to their actual efficacies against specific etiologic agents should contribute to a more parsimonious use of antibiotics, thus preserving their activities for the benefit of both human and animal health. Further investigations in other animal models should confirm this hypothesis.

3.3 Introduction

In veterinary medicine and human medicine, the fight against antimicrobial resistance requires the reduction of antimicrobials consumption through new regulatory requirements, the suppression of inappropriate uses, and also through the optimization of dosage regimens for appropriate uses. Such optimization of dosing regimens should more precisely take into account factors depending on the pathogens, the infection sites, the molecules, the hosts, and their interactions (Canton and Morosini, 2011). Conversely, to date, the doses of antibiotics proposed by manufacturers and cleared by authorities are very often labelled for a cluster of pathogens.

In this study, we worked on *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*, two Gram negative species of the *Pasteurellaceae* family which are the most often encountered bacterial aetiological agents of the cattle disease called BRD complex. These bacteria are at present targeted by the same drugs (belonging to the families of macrolides, phenicols, fluoroquinolones and 3rd generation cephalosporins) at the same dosage regimens registered for the overall disease. This situation with “disease claim” is representative of veterinary and human treatments of bacterial infections and we wondered if, in the context of prudent use of antimicrobial drugs, such “disease claim” could potentially be improved with more targeted doses adapted to the different aetiological agents.

The efficacy of an antibiotic treatment depends among diverse factors on the susceptibility of the targeted pathogens, and it is the reason why the MICs of antibiotics used against bacteria are combined with pharmacokinetic parameters to propose efficacious dosage regimens in preclinical trials. For fluoroquinolones, two PK/PD indices are correlated with the effectiveness of an antimicrobial treatment: AUC/MIC and C_{max}/MIC (Forrest et al., 1993). However, a set of studies have pointed out the limitations of MIC as the sole indicator to capture the complexity of interactions between bugs and drugs (Gehring and Riviere, 2013). These limitations are linked to the standard procedure for its determination that consists in assessing antibiotic activity on an inoculum of 5.10⁵ CFU/mL in the presence of constant concentrations of drugs and after a fixed time of incubation (CLSI, 2009). As an example, the standard MIC determination does not take into account the inoculum effect whereas several studies have stressed that higher antibiotic doses are needed to eradicate high bacterial inocula at the site of infection (Ferran et al., 2009; Jumbe et al., 2003; Kesteman et al., 2009; Vasseur et al., 2014).

By using *in vitro* and *in vivo* assays, the aim of this study was to determine the activity of marbofloxacin, a fluoroquinolone used in veterinary medicine in Europe, against two strains of

two closely related bacterial species belonging to the same Familie (*Pasteurellaceae*) that have similar MICs and are targeted in the field by the same dosing regimens.

3.4 Material and methods

3.4.1 Bacterial strains, media, antibiotic and reagents

A strain of *M. haemolytica* serotype A2, isolated in 2010 in the Netherlands from the lungs of a calf with clinical signs of BRD, and a strain of *P. multocida* isolated in a diseased pig in France were used in this study.

Mueller Hinton (MH) broth and agar and Brain Heart Infusion Broth (BHIB) were purchased from Biomerieux.

Marbofloxacin was provided by Vetoquinol SA and used for MIC and MBC determinations and for time-kill experiments. For *in vitro* testing, the powder was diluted in sterile distilled water from a stock solution at 1 mg/mL stored at -20°C. For *in vivo* testing (mice challenge), a commercial formulation of marbofloxacin for veterinary use approved in France (Marbocyl 10% ®) was used immediately after dilution in sterile distilled water.

3.4.2 In vitro testing

3.4.2.1 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

MIC were determined in triplicate according to the CLSI reference methods (CLSI, 2009). MIC were also determined in Brain Heart Infusion Broth (BHIB) with bacterial inocula of 5.10^5 CFU/mL, using the same microdilution method since BHIB gave better growth of both strains and was used for killing curves experiments.

Bactericidal effects were determined with bacterial inocula of 10^5 CFU/mL and 10^8 CFU/mL, from time kill experiments by subculturing in MH agar plates, where wells with no visible growth were observed. The minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the lowest marbofloxacin concentration giving a decrease of more than $3\log_{10}$ CFU/mL (99.9%) at 24h.

3.4.2.2 Time kill experiments

After overnight growth on MH agar plates, inocula of *M. haemolytica* and *P. multocida* were prepared by transferring several colonies into fresh BHIB to obtain suspensions containing 10^5 CFU/mL and 10^8 CFU/mL. Suspensions were incubated for one hour at 37°C to reach exponential growth phase before adding marbofloxacin at different concentrations (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 16 and 32 fold the MIC). Aliquots of 500 μL were removed from bacterial suspensions at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 24h after incubation at 37°C . They were centrifuged at 3000g for 10 minutes and pellets were then resuspended in 500 μL of 0.9% NaCl to eliminate the carryover of marbofloxacin. Ten μL of successive 10-fold dilutions were plated on MH agar. The colonies were counted after 24h of incubation at 37°C . The detection limit of colony counting was 100 CFU/mL.

3.4.2.3 Mean Inoculum growth

From each time-kill curve, we calculated the Area Under the Curve (AUC) of bacterial counts from time 0 to 24h. This AUC was divided by 24 hours to obtain an average inoculum size over the investigated time interval (24 hours) for each x tested marbofloxacin concentration (Forrest et al., 1993). The basal inoculum (I_{BASAL}) was equal to the inoculum size before exposure to marbofloxacin. Mean inoculum growth ($\Delta I(x)$) was then defined by Equation 1:

$$\Delta I(x) = I_x - I_{\text{BASAL}} \quad (\text{Equation 1})$$

where $\Delta I(x)$ is expressed in log CFU/mL, I_x (log CFU/mL) is the mean inoculum obtained after exposure to a given marbofloxacin concentration x and I_{BASAL} (log CFU/mL) is the inoculum size before exposure to marbofloxacin.

3.4.2.4 Modelling of mean inoculum growth

Mean inoculum growth was modelled as a function of marbofloxacin concentration, using a sigmoid dose-response effect model implemented in the WinNonlin© software version 5.3 (Pharsight, Mountain View). We re-parameterized equations previously used elsewhere (Ferran et al., 2013; Regoes et al., 2004) which are derived from a classical sigmoid E_{max} model, to obtain

Equations 2 and 3 allowing to directly calculate two parameters of interest, *i.e.* EC_{-3log} the antimicrobial concentration producing a reduction of 3log₁₀ (99.9 % reduction) of the basal inoculum of 10⁵ CFU/mL, and EC_{-5log} the antimicrobial concentration producing a reduction of 5log₁₀ (99.999 % reduction) of the basal inoculum of 10⁸ CFU/mL.

$$\Delta I(x) = \Delta I_{MAX} - \frac{(\Delta I_{MAX} - \Delta I_{MIN}) \times \left(\frac{x}{EC_{-3log}} \right)^\gamma}{\left(\frac{(-3 - \Delta I_{MIN})}{(\Delta I_{MAX} + 3)} \right) + \left(\frac{x}{EC_{-3log}} \right)^\gamma} \quad (\text{Equation 2})$$

$$\Delta I(x) = \Delta I_{MAX} - \frac{(\Delta I_{MAX} - \Delta I_{MIN}) \times \left(\frac{x}{EC_{-5log}} \right)^\gamma}{\left(\frac{(-5 - \Delta I_{MIN})}{(\Delta I_{MAX} + 5)} \right) + \left(\frac{x}{EC_{-5log}} \right)^\gamma} \quad (\text{Equation 3})$$

where $\Delta I(x)$ (log CFU/mL) is the mean inoculum growth for marbofloxacin concentration x , ΔI_{MAX} and ΔI_{MIN} (log CFU/mL) the maximal and minimal inoculum growth, obtained without antibiotic (ΔI_{MAX}) or after exposure to the highest marbofloxacin concentration (ΔI_{MIN}), x ($\mu\text{g/mL}$) the tested marbofloxacin concentration, EC_{-3log} ($\mu\text{g/mL}$) the antimicrobial concentration producing a reduction in the basal inoculum of 3 log₁₀, *i.e.* $\Delta I(EC_{-3log}) = -3$, EC_{-5log} ($\mu\text{g/mL}$) the antimicrobial concentration producing a reduction in the basal inoculum of 5 log₁₀, *i.e.* $\Delta I(EC_{-5log}) = -5$, and γ the sigmoid coefficient of the curve. These values of the mean inoculum changes (-3 log₁₀ and -5 log₁₀) were chosen to take into account the size of the initial inoculum (5 log₁₀ and 8 log₁₀). In both cases, the remaining inoculum (2 or 3 log₁₀) can be considered as similar, and low enough to be eradicated *in vivo* by the host natural defences.

3.4.3 In vivo testing

3.4.3.1 Animals

All animal procedures were carried out in accordance with international accepted standards of animal care under agreement number TOXCOM/0022/AF GL (Ethic committee: Comité d'éthique de Pharmacologie-Toxicologie de Toulouse-Midi Pyrénées, France #C2EA-86) for animal experimentation of French Ministry of Agriculture.

Eighty female Swiss mice weighing 20 to 30g (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) and aged from 8 to 12 weeks were conditioned in our laboratory at least for one week before experimentation. Animals were housed with a 12 hours day-night cycle in a temperature (22°C) controlled room in autoclavable type II L cages with filters on Souralit® (hygiene animal bedding) and had water and food (Tecklad global diet 2014 Harlan®) access ad libitum.

3.4.3.2 Induction of neutropenia

Cyclophosphamide (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was administered intraperitoneally to mice at doses of 150 mg/kg 4 days before inoculation, and 100 mg/kg one day before inoculation.

3.4.3.3 Lung infection model

Mice were purchased specific pathogen free and the health status was checked twice a day before and during experiments. We verified mobility, respiratory movements and piloerection. If immobility was observed, we euthanized animals with the humane method described below. These animals were included in the “dead group”. If piloerection and/or increase of respiratory movements were detected, the mice were more carefully observed during the day.

On day 0, mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of 0.17 mg/kg medetomidine (Domitor®, Zoetis, France) and 80 mg/kg ketamine (Chlorketam®, Vétoquinol, France).

The tracheas were cannulated with a 22 G catheter without mandrel. The lungs were inoculated with 20µL of *M. haemolytica* or *P. multocida* suspension containing 5×10^{11} CFU/mL, corresponding to a total of 1×10^9 CFU/lung. To constitute a control, 2 mice remained uninfected and were isolated in a separate box.

Three hours after bacterial challenge, mice received a single intraperitoneal injection of marbofloxacin. Eight groups of 10 to 13 mice were randomly constituted and were treated with 0, 1, 5, 10, 20 or 40 mg/kg of marbofloxacin for the mice inoculated with *M. haemolytica*, and with 0 or 40 mg/kg of marbofloxacin for the mice inoculated with *P. multocida*. For ethical reasons, only 4 to 8 mice were allocated in groups with low variability.

Clinical signs of disease and mortality were recorded over 48h, and at day 2 after challenge, all surviving mice were sacrificed humanely by an intraperitoneal injection of 120 mg/kg

pentobarbital sodium (Dolethal®, Vétoquinol, France). The lungs were aseptically removed and homogenized in 5mL of 0.9% NaCl. The homogenates were centrifuged at 3000 g for 10 minutes and the pellets resuspended in 2 mL of 0.9% NaCl. Ten μ L of successive 10-fold dilutions were then plated on MH agar. The bacterial counts per lung were recorded after 24h of incubation at 37°C. The detection limit of colony counts was 200 CFU/lung. Mice were then divided into 3 categories regarding the effect of marbofloxacin: “persistent infection” (decrease in bacterial load $<3\log_{10}$ CFU in lungs), “bactericidal effect” (decrease in bacterial load $>3\log_{10}$ CFU in lungs), “bacterial eradication” (bacterial counts below the LOQ). In the follow-up, dead mice were classified into the “persistent infection” category.

The bacterial counts in lungs after 48 h were compared with an analysis of variance followed by a Dunnett comparison.

3.5 Results

3.5.1 In vitro testing

3.5.1.1 MIC and MBC results

For both bacterial species the values of MIC, MBC and the ratio MIC/MBC are shown in Table 1. The MIC values of marbofloxacin were 0.03 μ g/mL for *M. haemolytica*, and 0.016 μ g/mL for *P. multocida*. These values were identical in MHB and BHIB.

Tableau 3-1 : Marbofloxacin MIC and MBC determined in BHIB for *M. haemolytica* and *P. multocida*

	MIC (μ g/mL)	MBC (μ g/mL)	MBC/MIC ratio
<i>M. haemolytica</i>	0.03		
low inoculum		0.023	0.75
high inoculum		0.03	1
<i>P. multocida</i>	0.016		
low inoculum		0.03	2
high inoculum		0.12	8

MIC were determined with a standard inoculum of 5.10^5 CFU/mL.
MBC were extracted from time-kill experiments.
Low inoculum: 5.10^5 CFU/mL. High inoculum: 5.10^8 CFU/mL.

The MBC values observed with the standard inoculum of 5.10^5 CFU/mL showed very slight differences, *i.e.* equal or less than one 2-fold dilution, compared to the corresponding MIC values for both *M. haemolytica* (0.023 $\mu\text{g/mL}$) and *P. multocida* (0.03 $\mu\text{g/mL}$), as indicated by MBC/MIC ratios (Low inoculum, Table 1). The MBC value obtained with the 5.10^8 CFU/mL inoculum was equal to the MIC (0.03 $\mu\text{g/mL}$) for *M. haemolytica*, but was 8-fold the MIC (0.12 $\mu\text{g/mL}$) for *P. multocida* (High inoculum, Table 1).

3.5.1.2 Time-kill curves

The time-kill curves of *M. haemolytica* and *P. multocida* exposed to different concentrations of marbofloxacin are presented in Figure 1.

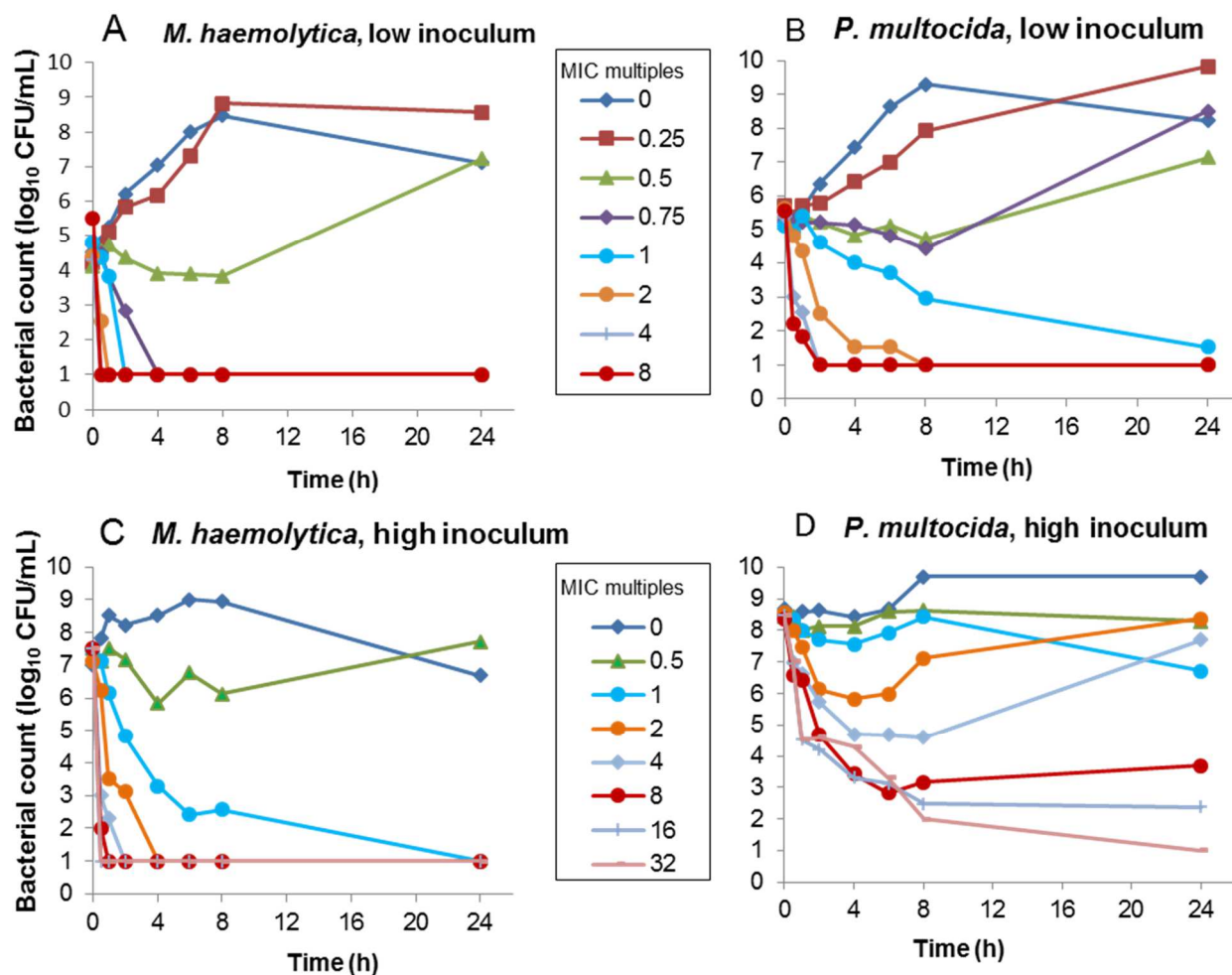


Figure 3-1 : Time-kill curves of low (10^5 CFU/mL) (A and B) and high (10^8 CFU/mL) (C and D) inocula of *M. haemolytica* (A and C) and for *P. multocida* (B and D) in the presence of marbofloxacin (concentrations shown in multiple of the MIC (MIC = 0.016 $\mu\text{g/mL}$ for *P. multocida* and MIC = 0.03 $\mu\text{g/mL}$ for *M. haemolytica*)).

For *M. haemolytica*, we obtained a concentration-dependant bactericidal effect. For the low inoculum of 10^5 CFU/mL the MBC was equal to $0.75 \times \text{MIC}$. Marbofloxacin killed 99.9% of the bacteria within 0.5h at concentrations higher than $2 \times \text{MIC}$, within 2h at $1 \times \text{MIC}$ and within 4h at $0.75 \times \text{MIC}$.

For the high inoculum (10^8 CFU/mL), marbofloxacin killed 99.9% of the bacteria within 0.5h at concentrations $\geq 4 \times \text{MIC}$, within 1h at $2 \times \text{MIC}$, and within 2h at $1 \times \text{MIC}$.

For *P. multocida*, the results obtained with the low inoculum of 10^5 CFU/mL were similar to those observed with *M. haemolytica*. The MBC of marbofloxacin was equal to $1 \times \text{MIC}$, even if the effect was slower than for *M. haemolytica* (killing $< 3 \log_{10}$ at 8h). In addition, marbofloxacin achieved 99.9% killing within 0.5, 1 and 2h at concentrations of $8 \times$, $4 \times$ and $2 \times \text{MIC}$, respectively. For the high inoculum of 10^8 CFU/mL *P. multocida*, the MBC was $\geq 8 \times \text{MIC}$; marbofloxacin achieved 99.9% killing within 1h at concentrations $\geq 16 \times \text{MIC}$, 2h at $8 \times \text{MIC}$. At $4 \times \text{MIC}$, a transitory bactericidal activity was observed for the first 8 hours but a regrowth was observed at 24h.

3.5.2 Pharmacodynamic modelling

The relations between inoculum changes and marbofloxacin concentrations are presented in Figure 2. The observed data were fitted with the models described by Equations 2 and 3, and the pharmacodynamic parameters are presented in Table 2.

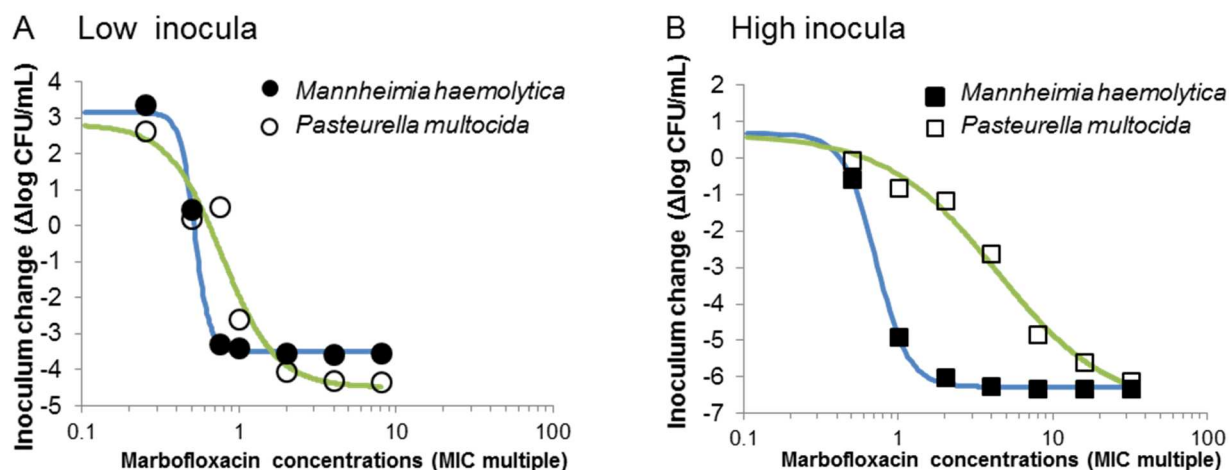


Figure 3-2: Bactericidal effect of marbofloxacin against low (A) and high (B) inocula of *M. haemolytica* (full symbols) and *P. multocida* (open symbols) isolates.

For the low inoculum of both *M. haemolytica* and *P. multocida*, concentration-effect curves were close, with marbofloxacin concentrations associated with $\square I = -3$ around $1 \times \text{MIC}$ (see Figure 2,

upper panel). Indeed, data fitting using Equation 2 indicated that EC_{-3log} (concentrations associated with $\square\square I=-3$) were 0.69xMIC and 1.34xMIC for *M. haemolytica* and *P. multocida*, respectively. The ratio of EC_{-3log} for *P. multocida* and *M. haemolytica* was 1.95 (Table 2).

Tableau 3-2: Pharmacodynamic parameters^a describing the antimicrobial activity of marbofloxacin against different inoculum sizes of *M. haemolytica* (MH) and *P. multocida* (PM) in BHIB.

Basal inoculum (Log ₁₀ CFU/mL)	Bacteria	EC _{-3log} ^b or EC _{-5log} ^c (MIC multiple)	PM/MH ratio	γd	Δ_{IMAX} ^e (Log ₁₀ CFU/mL)	Δ_{IMIN} ^f (Log ₁₀ CFU/mL)
5	MH	0.69±0.05 ^b		9.14±2.12	3.15±0.12	-3.50±0.09
	PM	1.34±0.29 ^b	1.95	2.53±1.06	2.82±0.69	-4.49±0.60
8	MH	1.03±0.02 ^c		4.17±0.21	0.67±0.10	-6.28±0.04
	PM	10.0±1.53 ^c	9.71	1.34±0.32	0.57±0.35	-6.70±0.65

^a Mean ±SE of parameters calculated with Equations 2 and 3 (sigmoid E_{max} model)

^b Antibiotic concentration reducing by 3 log₁₀ the basal inoculum of 10⁵ CFU/mL

^c Antibiotic concentration reducing by 5 log₁₀ the basal inoculum of 10⁸ CFU/mL

^d Sigmoid coefficient of the curve.

^e Maximal growth compared to the basal inoculum.

^f Minimal growth (maximal killing) compared to the basal inoculum.

For the high inoculum, the concentration-effect curve of *M. haemolytica* (Figure 2, lower panel) showed that inoculum changes occurred in a concentration range of marbofloxacin similar to that observed with the low inoculum of *M. haemolytica* (between 0.5 and 2- fold the MIC). Conversely, the concentration-effect curve for the high inoculum of *P. multocida* was dramatically shifted to the right, indicating that the marbofloxacin concentrations required to achieve the same magnitude of inoculum change were much higher with *P. multocida* than with *M. haemolytica*. Data fitting using Equation 3 indicated that EC_{-5log} (concentrations associated with $\square\square I=-5$) were 1.03xMIC and 10.0xMIC for *M. haemolytica* and *P. multocida*, respectively (Table 2). The ratio of EC_{-5log} for *P. multocida* and *M. haemolytica* was 9.74 (Table 2).

3.5.3 Infection model

3.5.3.1 Clinical outcomes: mouse survival

Mice that were not infected showed normal activity and no death, during the whole experiment. The results obtained in the different groups of infected mice are presented in Table 3.

Tableau 3-3: Effect of the different marbofloxacin doses on the survival and clinical and bacteriological cure of mice infected with *P. multocida* or *M. haemolytica*.

Marbofloxacin dose (mg/kg)	<i>M. haemolytica</i>						<i>P. multocida</i>	
	0	1	5	10	20	40	0	40
Number of mice	13	4	10	12	12	8	4	11
% of mice with clinical signs	100	100	60	58	80	0	100	100
% of surviving mice	85	100	100	100	100	100	0	100
% of mice with bacterial eradication	0	0	10	25	33	37	0	0
% of mice with bactericidal effect	0	0	50	33	58	63	0	9
% of mice with persistent infection	100	100	40	42	9	0	0	9

Bacterial eradication: bacterial counts below the LOQ; bactericidal effect: decrease in bacterial load $>3\log_{10}$ CFU; persistent infection: decrease in bacterial load $<3\log_{10}$ CFU.

In the two infected/non-treated groups (0 mg/kg marbofloxacin dose), all the mice infected with *M. haemolytica* or *P. multocida* presented clinical signs of disease. About 15% (2/13) of the mice infected with *M. haemolytica* died between 36-48 h post-challenge, and 100 % (4/4) of the mice infected with *P. multocida* died between 12-36 h post-challenge (85% and 0% survival at 48 h, respectively, Table 3).

In the group of mice infected with *P. multocida* and treated with the 40 mg/kg marbofloxacin dose, 100% (11/11) of the mice showed persistent clinical signs of infection (they developed mildly scruffy coat and were prostate) and were still alive at 48h post-challenge (Table 3).

In the groups of mice infected with *M. haemolytica* and treated with the 40 mg/kg marbofloxacin dose, 100% survival was observed at 48 h post-challenge and none of the mice showed any clinical

signs of disease. When using decreasing doses of marbofloxacin (20, 10, 5 and 1 mg/kg) in mice infected with *M. haemolytica*, 100% survival was observed at 48 h post-challenge and the percentage of mice presenting clinical signs progressively increased from 20% to 100% (Table 3).

3.5.3.2 Microbiological outcomes: pulmonary bacterial loads

The lung bacterial counts measured in mice 48h after the challenge are reported in Figure 3.

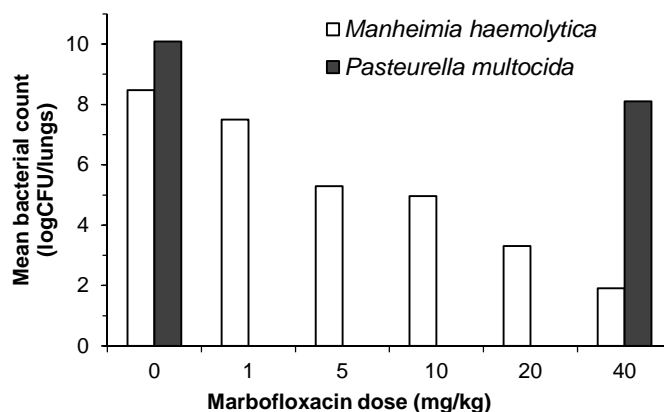


Figure 3-3: Mean bacterial counts in the lungs of mice infected with *P. multocida* (dark bars) or with *M. haemolytica* (white bars) after intraperitoneal administrations of different doses of marbofloxacin. Different letters in superscript above bars indicate that values are statistically different.

The mean bacterial counts in the lungs of untreated animals infected with *M. haemolytica* and *P. multocida* were 8.48 ± 0.97 and $10.08 \pm 0.06 \log_{10}$ CFU/lung, respectively.

The 40 mg/kg marbofloxacin dose led to a dramatic decrease in the mean bacterial counts for *M. haemolytica* infected mice ($1.91 \pm 0.90 \log_{10}$ CFU/lung) compared to the untreated group ($8.48 \pm 0.97 \log_{10}$ CFU/lung), whereas the mean bacterial counts were only slightly decreased for *P. multocida* infected mice (8.10 ± 1.30 versus $10.08 \pm 0.06 \log_{10}$ CFU/lung). For *M. haemolytica* infected mice, decreasing the marbofloxacin doses from 20 to 1 mg/kg showed a progressive increase in the mean bacterial loads in the lungs at 48h post-challenge. An analysis of variance followed by a Dunnett comparison indicated that the mean bacterial count for 1 mg/kg was not significantly different ($p > 0.05$) from the untreated group, whereas the mean bacterial counts were significantly decreased compared to the control group for the 5 mg/kg and higher doses ($p < 0.05$).

The percentages of mice exhibiting “persistent infection” (decrease in bacterial load $< 3 \log_{10}$ CFU), “bactericidal effect” (decrease in bacterial load $> 3 \log_{10}$ CFU), or “bacterial eradication” (bacterial counts below the LOQ) are presented in Table 3.

The 40 mg/kg marbofloxacin dose produced bacterial eradication or a bactericidal effect in 37% and 63% of mice infected with *M. haemolytica*, respectively. In mice infected with *P. multocida*, the 40 mg/kg marbofloxacin dose produced no bacterial eradication, and only a 9% bactericidal effect.

In mice infected with *M. haemolytica*, the decrease in marbofloxacin doses from 20 to 1 mg/kg was correlated with an increase in the percentage of mice with persistent infection: 9%, 42%, 40% and 100% for the marbofloxacin doses of 20, 10, 5 and 1 mg/kg, respectively.

3.6 Discussion

In the present study, in a mouse model of pulmonary infection we assessed the efficacy of a fluoroquinolone treatment with marbofloxacin against two bacterial species with close MICs. We focused our study on two bacterial species leading to the same disease, classically targeted by the same registered antimicrobial agents and doses and belonging to the *Pasteurellaceae* family: *M. haemolytica* and *P. multocida*.

Our main result demonstrated that the dose of marbofloxacin required to cure the infection was dramatically different depending on the bacterial pathogen responsible for the experimental pneumonia in mice, despite the fact that these pathogens have similar MICs and are closely genetically related (*Pasteurellaceae* family). Moreover, *in vitro* assessment of the antibacterial activity of marbofloxacin against both bacterial species demonstrated that the inoculum effect, that corresponds to the decrease of antibacterial activity when inoculum size increases, and which was previously identified as an important factor of antimicrobial efficacy of fluoroquinolone (Ferran et al., 2007; Mizunaga et al., 2005; Udekwu et al., 2009), was also dramatically different in magnitude between the two bacterial species.

Our first objective was to develop a rodent model of pulmonary infection with *M. haemolytica* or *P. multocida* to enable clinical and bacteriological outcomes to be assessed after marbofloxacin treatments. In our experiments, we chose to depress the immune response of the mice, by the administration of cyclophosphamide before the course of challenges (Andes and Craig, 2002) to get similar bacterial counts at the time of treatment with both bacteria. Neutropenia enabled overt disease to be established and the comparison of the effects of marbofloxacin on both bacterial species, by minimizing the animal "effect" or the implication of the natural (specific and non-specific) defence.

In this pneumonia model, we first evaluated the clinical and microbiological outcomes after marbofloxacin treatment at a dose of 40 mg/kg. This dose had already been tested in a pneumonia model with *P. multocida* in immunocompetent mice (Ferran et al., 2011). In the present study with immunocompromised mice infected by *P. multocida*, the 40 mg/kg dose prevented mortality at 48 h post-challenge, but it produced neither a clinical cure nor a significant decrease in the bacterial loads in the lungs. Conversely, the 40 mg/kg dose in immunocompromised mice challenged with *M. haemolytica* was associated with a 100% clinical cure rate and a significant microbiological effect in all treated mice (including a microbiological cure rate of 40%). We then decided to explore the magnitude of this differential drug efficacy by treating *M. haemolytica* infected mice with decreasing doses of marbofloxacin. For ethical reasons, as the 40 mg/kg dose was poorly effective against *P. multocida*, we did not test lower doses of marbofloxacin in *P. multocida* infected mice. After testing marbofloxacin doses of 20, 10, 5 and 1 mg/kg, we demonstrated that the 5 mg/kg dose was the lowest dose producing better clinical and microbiological outcomes in the *M. haemolytica* pneumonia than the 40 mg/kg marbofloxacin dose in the *P. multocida* pneumonia (Figure 3 and Table 3).

We explored *in vitro* using time-kill experiments the antibacterial activity of marbofloxacin against both *P. multocida* and *M. haemolytica* strains. The bacteriological results were expressed in terms of mean inoculum changes over 24 h, and analysed as a function of marbofloxacin concentrations (Ferran et al., 2013; Regoes et al., 2004). With initial inocula of 10^5 CFU/mL, the marbofloxacin concentrations producing a 99.9% ($-3 \log_{10}$) reduction in the basal inoculum were similar between the two bacterial strains and close to their respective MICs (0.69xMIC for *M. haemolytica* and 1.34xMIC for *P. multocida*, Table 2). Similar results were obtained by Ferran et al. (Ferran et al., 2011) with *P. multocida* (2.06xMIC) and *E. coli* (1.80xMIC). This is in agreement with the observation that the MBC of marbofloxacin was close to the MIC for both *P. multocida* and *M. haemolytica*. Altogether, these results support the view that MIC is a relevant indicator of the marbofloxacin bactericidal effect against low bacterial inocula.

Using initial inocula of 10^8 CFU/mL, huge differences were observed when comparing the marbofloxacin activity against *P. multocida* and *M. haemolytica* strains (Figure 2, lower panel; Table 2).

For *P. multocida*, the concentration-response curve was shifted to the right of the x-axis, and the marbofloxacin concentration that gave a 99.999% ($-5 \log_{10}$) reduction in the basal inoculum was about 10-fold the MIC. These results are evidence of the *inoculum effect*, consisting of a reduction in the antibiotic activity while bacterial inoculum size increases. This effect was previously

demonstrated with *P. multocida* (Ferran et al., 2011) and with other Gram-negative and Gram-positive bacterial species (Ferran et al., 2007; Mizunaga et al., 2005; Morrissey and George, 1999; Udekwa et al., 2009).

Unexpectedly, the concentration-response curve for *M. haemolytica* remained close to that obtained with the 10^5 CFU/mL inoculum, and the marbofloxacin concentrations associated with a 99.999% ($-5 \log_{10}$) reduction in the basal inoculum was 1.03xMIC which is similar to the value obtained with a $-3 \log_{10}$ reduction of the 10^5 CFU/mL inoculum (0.69xMIC). The same result was obtained with another strain of *M. haemolytica* (data not shown). *M. haemolytica* is, to our knowledge, the first reported bacterial species that does not exhibit such an *inoculum effect* for a fluoroquinolone.

Interestingly, the results obtained *in vitro* with the high inocula (10^8 CFU/mL) of *P. multocida* and *M. haemolytica* (Figure 2) mirror those obtained *in vivo* in the pneumonia model produced with a bacterial load of 10^9 CFU/lung. Indeed, the ratio of *in vitro* effective concentrations ($EC_{-5\log}$) for *P. multocida* and *M. haemolytica* was equal to 9.71 (Table 2), and the ratio of *in vivo* doses producing similar responses for *P. multocida* and *M. haemolytica* was about 8 (40 mg/kg for *P. multocida* and 5 mg/kg *M. haemolytica*).

In a set of published works, it has been demonstrated in experimental models of infections that the antimicrobial activity of fluoroquinolones or third-generation cephalosporins could be reduced against high bacterial loads compared to low bacterial loads of different bacterial species, including *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* (Ferran et al., 2007; Ferran et al., 2009; Kesteman et al., 2009; Mizunaga et al., 2005). In all these cases, *in vitro* time-kill experiments have shown the occurrence of an inoculum effect.

Altogether, these data suggest that the higher activity of marbofloxacin in the pneumonia induced by a high inoculum of *M. haemolytica* compared to *P. multocida* was potentially linked to the absence of an inoculum effect in *M. haemolytica*. Therefore, it might be speculated that marbofloxacin was as effective against the high inoculum of *M. haemolytica* as it would be against a low inoculum. Unfortunately, this situation could not be tested in our model of infection because of the low pathogenicity of *M. haemolytica* in mice, which did not produce overt clinical symptoms of disease with a low bacterial load.

In conclusion, our study is the first to our knowledge demonstrating that the optimal antibiotic dose of a fluoroquinolone was markedly different between two bacterial species that exhibit similar MIC and are closely related genetically. The growing human and animal health issues related to the spread of antimicrobial resistance have introduced the notion of “as little as possible, as much as necessary” for any use of antibiotics, especially in food-producing animals. As already stated, the optimization of antibiotic dosing regimens should play an important role to achieve this objective (Canton and Morosini, 2011), and our present finding should stimulate further research to determine optimal bacterial species-specific antibiotic doses.

3.7 References

- Andes, D., Craig, W.A., 2002, Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1665-1670.
- Canton, R., Morosini, M.I., 2011, Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 35, 977-991.
- CLSI, 2009, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition. Document M7-A8 29-2.
- Ferran, A., Dupouy, V., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2007, Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 4163-4166.
- Ferran, A.A., Bibbal, D., Pellet, T., Laurentie, M., Gicquel-Bruneau, M., Sanders, P., Schneider, M., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2013, Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the effects of parenteral administration of a fluoroquinolone on the intestinal microbiota: comparison of bactericidal activity at the gut versus the systemic level in a pig model. *Int J Antimicrob Agents* 42, 429-435.
- Ferran, A.A., Kesteman, A.S., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009, Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3384-3390.
- Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2011, Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection. *Vet Microbiol* 148, 292-297.
- Forrest, A., Nix, D.E., Ballow, C.H., Goss, T.F., Birmingham, M.C., Schentag, J.J., 1993, Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1073-1081.
- Gehring, R., Riviere, J.E., 2013, Limitations of MIC as the sole criterion in antimicrobial drug dosage regimen design: the need for full characterization of antimicrobial pharmacodynamic profile especially for drug-resistant organisms. *Vet J* 198, 15-18.

- Jumbe, N., Louie, A., Leary, R., Liu, W., Deziel, M.R., Tam, V.H., Bachhawat, R., Freeman, C., Kahn, J.B., Bush, K., Dudley, M.N., Miller, M.H., Drusano, G.L., 2003, Application of a mathematical model to prevent *in vivo* amplification of antibiotic-resistant bacterial populations during therapy. *J Clin Invest* 112, 275-285.
- Kesteman, A.S., Ferran, A.A., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Sanders, P., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009, Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4740-4748.
- Mizunaga, S., Kamiyama, T., Fukuda, Y., Takahata, M., Mitsuyama, J., 2005, Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on *in vitro* activities and *in vivo* efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 56, 91-96.
- Morrissey, I., George, J.T., 1999, The effect of the inoculum size on bactericidal activity. *J Antimicrob Chemother* 43, 423-425.
- Munoz-Price, L.S., Poirel, L., Bonomo, R.A., Schwaber, M.J., Daikos, G.L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M.K., Kumarasamy, K., Livermore, D.M., Maya, J.J., Nordmann, P., Patel, J.B., Paterson, D.L., Pitout, J., Villegas, M.V., Wang, H., Woodford, N., Quinn, J.P., 2013, Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 13, 785-796.
- Regoes, R.R., Wiuff, C., Zappala, R.M., Garner, K.N., Baquero, F., Levin, B.R., 2004, Pharmacodynamic functions: a multiparameter approach to the design of antibiotic treatment regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3670-3676.
- Udekwu, K.I., Parrish, N., Ankomah, P., Baquero, F., Levin, B.R., 2009, Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 63, 745-757.
- Vasseur, M.V., Laurentie, M., Rolland, J.G., Perrin-Guyomard, A., Henri, J., Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2014, Low or high doses of cefquinome targeting low or high bacterial inocula cure *Klebsiella pneumoniae* lung infections but differentially impact the levels of antibiotic resistance in fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1744-1748.

4. CHAPITRE 4. IMPACT DE LA DOSE ET DE LA PRECOCITE
D'UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE AVEC UNE
FLUOROQUINOLONE SUR LES GUERISONS
BACTERIOLOGIQUE ET CLINIQUE ET L'EXTENSION DES
LESIONS PULMONAIRES APRES INFECTION
EXPERIMENTALE A MANNHEIMIA HAEMOLYTICA CHEZ
LE VEAU

Etude expérimentale n°2: **Impact of Timing and Dosage of a Fluoroquinolone Treatment on the Microbiological, Pathological and Clinical Outcomes of Calves Challenged with *Mannheimia haemolytica***

from G. Lhermie, AA. Ferran, S. Assié, H. Cassard, F. El Garch, M. Schneider, F. Woerhlé, D. Pacalin, M. Delverdier, A. Bousquet-Melou, G. Meyer

Soumis au journal FRONTIERS IN MICROBIOLOGY le 25 août 2015

4.1 Résumé en français

L'objectif de notre étude était d'évaluer, au cours d'un challenge expérimental d'infection pulmonaire chez le veau, l'efficacité d'une dose réduite de marbofloxacin (2 mg/kg) administrée précocement au cours de l'infection. Ce protocole a été comparé avec un traitement plus tardif à la dose recommandée de 10 mg/kg, en termes de guérisons bactériologique et clinique, et d'extension des lésions pulmonaires. Trente-deux veaux ont été inoculés par voie intratrachéale avec 4.10^7 CFU de *Mannheimia haemolytica* A1. Vingt-deux veaux ont été inclus dans la suite de l'étude sur la base d'une augmentation de leur température rectale dans les 10h après challenge, et répartis dans l'un des 4 groupes de traitement suivants, le groupe CON, recevant une injection intramusculaire unique de solution saline, le groupe E2, recevant 2 mg/kg de marbofloxacin 2-4 h après inclusion, les groupes L2 ou L10, recevant respectivement 2 ou 10 mg/kg de marbofloxacin 35-39 h après inclusion. L'évolution de la charge bactérienne pulmonaire a été suivie par PCR quantitative en temps réel sur des liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA), prélevés avant inclusion, aux temps de traitement précoce et tardif et à l'autopsie (110-130 heures après inclusion). A l'autopsie, des fragments de lobes pulmonaires ont également été prélevés et une quantification de *M. haemolytica* a été effectuée par PCR quantitative.

Dans le groupe CON, la charge bactérienne dans les LBA a augmenté à chaque prélèvement successif, confirmant le modèle infectieux. Au moment du traitement précoce, la charge bactérienne était en moyenne de 10^4 copies d'ADN/mL de LBA, et la dose de 2 mg/kg a permis une élimination rapide et totale de *M. haemolytica* chez tous les veaux. Au moment du traitement plus tardif, décalé de 36 heures, la charge infectieuse était en moyenne de 10^6 copies d'ADN/mL de LBA. La marbofloxacin a entraîné une réduction de la charge bactérienne dans les groupes L2 et L10, mais 3 veaux sur 6 du groupe L2 et 1 veau sur 6 du groupe L10 étaient encore positifs à J4 lors de la recherche de *M. haemolytica*.

D'un point de vue clinique, à l'exception des veaux du groupe CON, tous les veaux ont présenté une amélioration des symptômes dans les 24h après traitement. Cependant, le traitement précoce avec 2 mg/kg de marbofloxacin (E2) a été plus efficace que les deux traitements tardifs (L2 et L10) pour prévenir la formation de lésions pulmonaires, comme indiqué par le pourcentage de consolidation pulmonaire et le nombre de lésions macroscopiques et microscopiques. Les analyses tissulaires ont permis de mettre en évidence une efficacité bactéricide (mesurée par l'absence d'ADN bactérien dans l'ensemble des tissus pulmonaires prélevés) en moyenne 1.5 fois supérieure du traitement précoce sur les traitements tardifs.

Les résultats de notre étude démontrent pour la première fois sur une espèce cible d'intérêt vétérinaire qu'un traitement antibiotique administré à un stade d'infection précoce avec une dose plus faible, ciblant une charge bactérienne de faible taille, peut être au moins aussi efficace qu'un traitement plus tardif avec la dose habituellement recommandée et ciblant des charges bactériennes plus fortes. Une validation terrain de cette preuve expérimentale doit être maintenant envisagée.

4.2 Abstract

The efficacy of an early and low inoculum-adjusted marbofloxacin treatment was evaluated on microbiological and clinical outcomes in calves infected with 4.10^7 CFU of *Mannheimia haemolytica* A1. Twenty-two calves were included based on their rectal temperature rise in the 10 h after challenge and allocated in 4 groups, receiving a single intramuscular injection of saline (CON), or 2 mg/kg marbofloxacin 2-4 h after inclusion (early treatment, E2) or 2 or 10 mg/kg marbofloxacin (late treatment, L2, L10) 35-39 h after inclusion. In CON calves, *M. haemolytica* DNA loads in bronchoalveolar lavages continuously increased from inclusion to day 4, and were associated with persistent respiratory clinical signs and lung lesions. At times of early and late treatments, *M. haemolytica* loads ranged within 3.5-4 and 5.5-6 \log_{10} DNA copies/mL, respectively. Early 2 mg/kg marbofloxacin treatment led to rapid and total elimination of bacteria in all calves. The late treatments induced a reduction of bacterial loads, but 3 of 6 L2 and 1 of 6 L10 calves were still positive for *M. haemolytica* at day 4. Except for CON calves, all treated animals exhibited clinical improvement within 24h. However, early 2 mg/kg treatment was more efficacious to prevent pulmonary lesions, as indicated by the reduction of the extension and severity of gross lesions and the histopathological scores. These results demonstrated for the first time that a reduced antibiotic regimen given at an early stage of the disease and targeting a low bacterial load could be efficacious in a natural bovine model of pneumonia.

4.3 Introduction

Bovine respiratory disease (BRD) is a major economic concern in young beef cattle production, with a huge economic impact on the farming industry due to production losses and disease treatment and prevention (Agriculture, 2013). BRD is mostly multifactorial due to complex interactions between pathogens (virus and/or bacteria and/or fungi), animal (host) factors and non-infectious environmental variables, such as farm management determinants (Fulton, 2009). Among the Gram-negative bacteria, the virulence factors expressed by *Mannheimia haemolytica*, such as leukotoxin, make it the major bacterial agent of BRD, resulting in high mortality and loss of productivity in young calves (Van Donkersgoed et al., 1993; Zecchinon et al., 2005). At the herd level, the disease prevalence in suckler calves or young bull production is estimated to be approximately 15%, with high variability within herds. Recently, *M. haemolytica* was detected by real-time PCR in France in approximately 20% of respiratory samples from BRD (Pelletier, 2013).

Because of the high prevalence of Gram-negative bacteria as involved pathogens, the frequent association between bacteria and viruses, and the absence of pathogen identification in field conditions, the control of BRD generally includes the use of Gram-negative spectrum antibiotics (Apley, 1997; Fulton, 2009). Two therapeutic and strategic alternatives are commonly implemented by veterinarians and farmers. Current practice of early BRD treatment consists in treating the entire cohort of animals, in which only a few express clinical signs of BRD (Forbes et al., 2011; Nickell and White, 2010). The advantages of this approach are good survival rate in the cohort and ease of use (Nickell and White, 2010); it also has the disadvantage of subjecting a potentially large proportion of animals intended for human consumption to antibiotics when not required. A second therapeutic approach focuses on treating only the affected animals, regardless of the severity of their clinical signs (Heins et al., 2014; O'Connor et al., 2013). This approach limits exposure to antibiotics and decreases the risk of developing resistant strains. However, it is usually seen as the "late approach" because the clinical signs and possibly extensive pulmonary damage have had time to develop prior to treatment, as demonstrated for Pasteurellaceae (Ackermann and Brogden, 2000; Dagleish et al., 2010). Fluoroquinolones, such as marbofloxacin, represent a frequent "late approach" treatment for BRD in Europe. Considering the uncertainty regarding the causal agent and time of disease onset, labeled doses are determined by pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) and dose determination experiments. These doses generally target a cluster of pathogens and consider the highest minimal inhibiting

concentration (MIC) reported (Toutain et al., 2002; Valle et al., 2012). These conditions also lead to routine use of a “high” antibiotic dose.

Antimicrobial usage leads to unavoidable selection of resistance in pathogens and commensal bacteria (Courvalin, 2005, 2008). Previous evidence has demonstrated the transfer of resistant bacteria or genetic determinants of resistance between animals and humans (Aarestrup and Wegener, 1999; Angulo et al., 2004; Bywater, 2004). Therefore, a wide consensus in both human and veterinary medicine encourages the reduction of antimicrobial usage to reduce its potential impact on public health. Recent studies have stressed the interests of early therapeutic interventions, when the infectious bacterial load is low, suggesting that the dose of antibiotics may be modulated concurrently with the infectious bacterial load in both human and veterinary medicine (Ferran et al., 2007; Ferran et al., 2011; Martinez et al., 2012; Vasseur et al., 2014). For example, in an experimental mouse-lung infection model with *Pasteurella multocida*, a lower dosage of fluoroquinolone was required to achieve similar bacteriological outcomes when administered “early” compared with a late administration pattern (Ferran et al., 2011). Further, an in vitro study observed high bactericidal activity of marbofloxacin even at low doses on low inoculum of both *M. haemolytica* and *P. multocida* (Illambas et al., 2013). Up to now, such observations have not been reported in a natural host model. These findings open new perspectives regarding the rational use of antibiotics in farm animals, combining the objectives of reducing their consumption and preserving animal health. In this context, this study aimed to determine the impact of an early and decreased regimen of marbofloxacin on the bacteriological burden, the extent of pulmonary lesions and the clinical recovery in calves experimentally infected with *M. haemolytica* A1.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Bacteria and culture

M. haemolytica A1 strain 11-01-840 was isolated from the lungs of a calf with clinical signs of BRD in 2010 and stored at -80°C. Prior to each use, one aliquot of the strain was defrosted, and cultured on a Mueller Hinton Agar plate. The MIC was determined in Mueller Hinton Broth in triplicate according to the CLSI reference methods (CLSI, 2009). The MIC of marbofloxacin was 0.03 µg/mL.

M. haemolytica A1 strain 11-01-840 inoculum was prepared as follows: at day-1 (D-1) prior to inoculation, the strain was incubated overnight in 500 mL of brain heart infusion broth (BHIB) at 37°C; at day 0 (D0) just prior to inoculation, 50 mL of BHIB was centrifuged at 3000 g for 20 minutes; pellets were collected in 10 mL of 0.9% NaCl and washed twice in the same buffer; and the final pellet was then diluted into pre-warmed 0.9% NaCl to obtain a final suspension containing 2.10^5 CFU/mL. Each calf was inoculated with 200 mL of the final suspension.

4.4.2 Experimental infection of calves with *M. haemolytica*

Animal experimentation was performed as prescribed by the guidelines of the European Community Council on Animal Care (86/609/CEE), in accordance with accepted human standards of animal care, under ethical agreement number TOXCOM/0021/AF GL (French Ministry of Agriculture, Ethics Committee -C2EA-86).

Thirty-two dairy Holstein and Normand calves were selected at birth and reared until to 2-3 weeks of age (weight ranged from 47 to 75 kg) in French experimental units with no history of BRD (INRA, Domaine de Borculo, Exmes, France). Calves were colostrum-deprived after birth and fed with milk replacer and with a colostrum substitute (CER Marloie, Belgium) from day 2 to day 7 of age as previously described (Riffault et al., 2010). Calves were transported at two to three weeks of age and allocated to specific experimental units in collective pens of 3 to 4 animals with free access to hay and fresh water (experimental units of Toulouse, France). They were fed ad libitum with starter food (Passio Floc Junior, SudOuestAliments, Anan, France) and once a day with a milk replacer (Laitine Tech®, Bonilait-protéines, Chasseuneuil du Poitou, France). Upon arrival at the experimental unit, calves received a single intramuscularly injection of E-vitamin and selenium (0.025 mg/kg, Selephérol®, Vetoquinol, France) and underwent a complete physical examination. They remained fully healthy during the 8-day period prior to challenge. Absence of BVDV in calves was assessed at birth by negative real-time RT-PCR (Taqvet-BVDV kit, Lifetechnologie). Absence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine parainfluenza 3 virus (BPI3) was subsequently confirmed by negative serology of calves (LsiVet bovine RSV serum, Life technologies) and negative quantitative RT-PCR (Taqvet BRSV-bPI3 kit, Life technologies) on bronchoalveolar lavages (Ferran et al.) at D0 just prior to challenge with *M. haemolytica*. Absence of *M. haemolytica*

asymptomatic carriers was confirmed by negative qPCR (TaqVet™ Triplex *Pasteurella multocida* & *Mannheimia haemolytica*, Life technologies, USA) in nasal swabs two days prior to inoculation.

Challenge was performed in calves between 3.5 to 5.5 weeks of age by intratracheal route as previously described (Riffault et al., 2010). Briefly, calves were restrained (standing up); an area of 20 cm² was shaved at the median part of the neckline. Then, an 18 G catheter (Intraflon G18, Vycon) was inserted between two tracheal rings approximately 10 cm below the larynx. After location verification, 200 ml of pre-warmed solution containing 2.10^5 CFU/mL *M. haemolytica* was injected into the catheter, corresponding to a total of 4.10^7 CFU per calf.

Calves were allocated into four groups based on elevation of rectal temperatures after challenge. The basal temperature of each calf was calculated as the mean rectal temperature collected individually twice daily for the 3 days prior to challenge. After challenge, rectal temperatures were taken every three hours for a period of ten hours.

During this ten-hour period, twenty-two of 32 calves were included at time 0 (T0); their rectal temperature exceeded +1°C their previously basal temperature. Calves were randomly allocated to one of four groups. The control group (4 CON calves) received no antibiotic treatment; the E2 group (6 E2 calves) received an early single intramuscular (I.M) injection in the neck of 2 mg/kg marbofloxacin (Forcyl®, Vetoquinol, Lure, France) at T1, 2 to 4 hours after inclusion (T0). The L2 and L10 groups (6 L2 and L10 calves per group) were treated later at T2, at 35 to 39 hours post-inclusion T0 (33 to 35 hours later than the early treatment), with a single IM injection of 2 mg/kg or 10 mg/kg marbofloxacin respectively.

To summarize, E2 calves (early treatment) were treated between 2 to 4 hours and L2 and L10 calves (late treatment) between 35 to 39 hours post-inclusion, corresponding to 6 to 10 hours and 43 to 48 hours after *M. haemolytica* inoculation. Ten calves were excluded because they failed to develop hyperthermia (mean +1°C) in the 10-hour period after inoculation of *M. haemolytica*.

The experiment ended six days after challenge, between 110 to 134 hours post-challenge (time T3). Calves were euthanized during experimentation for ethical reasons or at T3 under general anesthesia overdose (5 mg/kg ketamine, followed by 15 mg/kg pentobarbital sodium and exsanguination).

4.4.3 Clinical examination and respiratory sampling

Clinical observations were recorded twice a day from three days prior to the end of experimentation, between 110 and 134 hours (T3) post-challenge. Rectal temperatures were measured every three hours for a period of ten hours after challenge, then twice daily, and at times of inclusion (T0) and early (T1), and late (T2) treatments.

Calves were monitored using a scoring system adapted from Dowling et al. (Dowling et al., 2002). Scores were assigned as follow: demeanor from 0 to 3 (normal, dull, depressed, or recumbent); rectal temperature from 0 to 2 (<39.5°C, 39.5-40.5°C, >40.5°C); respiratory rate from 0-3 (<45, 45-60, 60-90, >90); heart rate from 0 to 2 (<80, 80-100, >100); nasal discharge from 0 to 3 (absent, mild, moderate, or profuse); intensity and added lung sounds from 0 to 2 (normal, increased effort, or labored); and appetite from 0 to 2 (normal, decreased, or anorexic). The clinical score was calculated daily for each calf by adding the values recorded for each parameter. In addition, individual accumulated clinical scores (ACS) were calculated for each calf as the area under daily clinical scores using the trapezoid method.

Bronchoalveolar lavages were performed between 12 to 6 hours prior to challenge for all 32 calves and at the end of the experiment for the 22 included calves. In addition, for 3 calves of each group (CON, E2, L2 and L10), BALs were performed just prior to T1 and T2, the times of early and late treatments, respectively. BALs on living animals were performed under general anesthesia (10 mg/kg ketamine and 10 mg/kg diazepam) by endoscopy (Olympus®, CF-EL) as previously described (Deplanche et al., 2007). BALs after euthanasia were performed by direct extraction and lavages of the lungs as previously described (Riffault et al., 2010). The recovered suspension was collected and stored at -80°C directly or after mixing with TRIzol® (Life Technologies, Saint Aubin, France) for quantitative *M. haemolytica* PCR analysis.

4.4.4 Necropsy and tissue sampling

After euthanasia of the calves, gross lesions were photographed and assessed by visual examination and palpation of each of the pulmonary lobes. Moreover, the percentage of cranioventral lung consolidation was calculated as described by Amrine et al. (Amrine et al., 2014), as cranial and ventral lobes are the most common lesion sites.

Post-mortem samples were collected for histopathology and bacteriology, including cranial right and left, intermediate, cardiac and caudal left and right lobes of the lungs, as well as the mediastinal and tracheobronchial lymph nodes. For histopathology, tissue samples were paraffin wax-embedded after fixation in 10% neutral formalin, sectioned at 3-5 µm and stained with hemalun and eosin. A pathologist described and scored the severity of histopathology and inflammation in each slide as either normal (0), mild to moderate (1), or marked (2). A mild to moderate score of 1 was defined by fibrinous alveolitis with macrophagic infiltration, moderate quantities of mucus in the lumen of bronchioles and occasional few, small abscesses. A marked score of 2 was defined by hemorrhagic alveolitis with major leucocyte infiltration, alteration of neutrophils, foci of

necrosis surrounded by oat cells, interlobular edema and thrombosis, moderate quantities of mucus in the lumen of bronchioles and leucofibrinous pleuresia. A mean score of histopathological severity was calculated for each calf based on all lung tissue slides for that animal.

4.4.5 *M. haemolytica* quantification

M. haemolytica quantification was performed by bacterial titration on post-mortem samples and quantitative PCR on BAL and post-mortem samples of included calves.

For titration, 1 g of the tissue sample collected from the right apical lobe of the lung was homogenized in 9 mL of 0.9% NaCl. The homogenates were centrifuged at 3000 g for 10 minutes. The supernatants were discarded, and the pellets were resuspended in 10 mL of 0.9% NaCl. Ten microliters of successive 10-fold dilutions were then plated in triplicate on MH drug-free agar plates for incubation at 37°C. For all samples, bacterial counts were recorded after 24 h of incubation, and the lowest level of detection of colony counts was set at 100 CFU/g of tissue.

For quantitative PCR, DNA was extracted in elution buffer from 200 µL of BAL or 100 mg of tissue samples using a Macherey-Nagel nucleospin tissue genomic DNA kit. Five tissue samples were collected at the same location for each calf, including the right and left cranial, the accessory and the cardiac lobes of the lungs and the tracheobronchial lymphatic node. PCR was conducted with 5 µL of elution buffer (50 µL) with the TaqVet™ Triplex *Pasteurella multocida* & *Mannheimia haemolytica* kit (Life technologies, USA) according the manufacturer's instructions in a Light Cycler 480 (Roche). A standard plasmid curve for quantification was obtained by successive ten-fold dilutions of a plasmid containing 10⁶ DNA copies of the same *M. haemolytica* amplified nucleotide sequence (Life technologies, USA). In addition, two housekeeping genes previously mentioned in the literature (*gapdh* and *rpl19*) were amplified in each sample to normalize the qPCR products using GeNorm software (Biogazelle, qBase+). PCR results were analyzed using Roche Light Cycler 480 software (release 1.5.1) using the standard 2nd derivative and fit points methods for all samples (Roche Diagnostics). Results were similar when the PCR threshold was defined by the software (2nd derivative method) or fixed manually (fit points method) around 100 DNA copies. Results are expressed as the mean of PCR titers for each group and each day or as the accumulated bacterial shed (ABS), which corresponds to the mean area under individual curves of *M. haemolytica* detected by qPCR in BALs from T0 to T3 (GraphPad Prism software analysis, La Jolla, California, USA).

4.4.6 Statistical analysis

Statistical analysis were performed using GraphPad software (La Jolla, USA) or SAS (North Carolina State University, USA). A two-way ANOVA without repeated measures was used to compare the clinical and qPCR results. When effects of the “day” and “treatment” factors were significant among interactions, a Bonferroni test between contrasts was used to compare the treatments on each day. A one-way ANOVA without repeated measures was used to compare the histopathological score, ABS and ACS. When the effect of the “treatment” factor was significant, a Newman-Keuls test was used to compare the treatment effects at each time point.

4.5 Results

4.5.1 Kinetics of *M. haemolytica* loads in bronchoalveolar lavages

The mean DNA loads of *M. haemolytica* in BAL over time as well as the mean accumulated bacterial shedding (ABS) scores are presented in Fig.1 for 3 calves of each group.

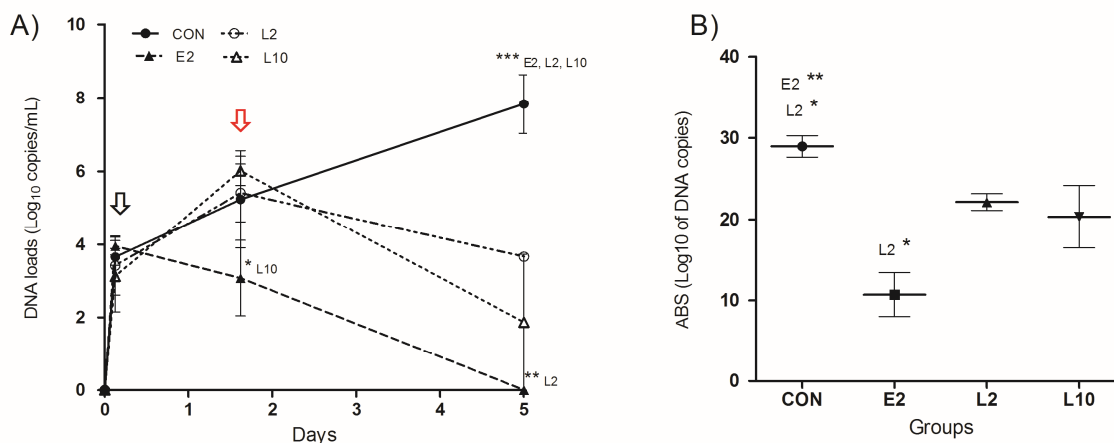


Figure 4-1 : Mean titers (with standard deviations) of *M. haemolytica* DNA copies in bronchoalveolar lavages (A) and mean accumulated bacterial shed (B) in calves treated with 2 mg/kg (E2) marbofloxacin at 4 h after inclusion (E2) or 2 mg/kg (L2) or 10 mg/kg (L10) marbofloxacin at 36 h after inclusion. The black and red arrows indicate the time of early and late treatments respectively. Significant differences: * p<0.05; ** p <0.01

In the CON group, *M. haemolytica* DNA loads increased regularly over time from inclusion (T0) to the end of the experiment (T3) in all the three tested calves, from 3.3 to 8.6 log₁₀ DNA copies/mL

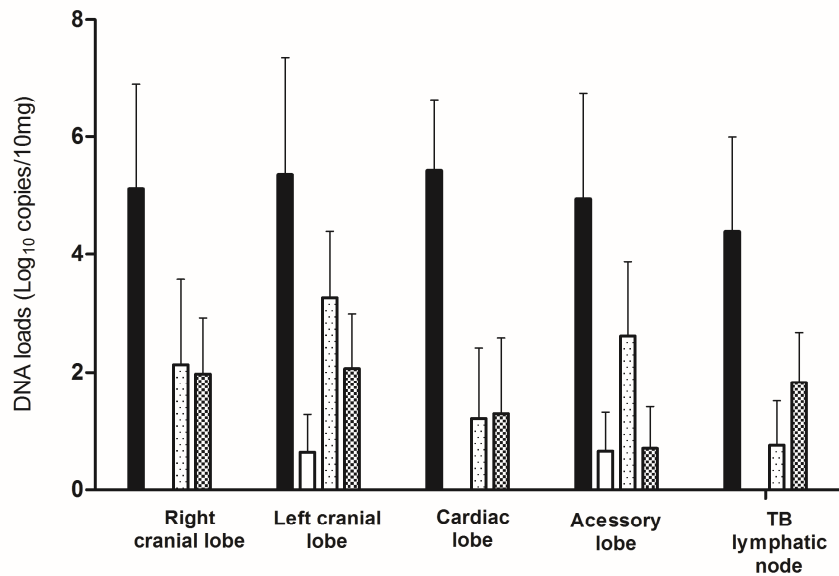
of BAL), suggesting strong replication of the bacteria in the lower respiratory tract. At T1, just prior to early treatment, bacterial DNA loads were similar between the four groups, at approximately $3 \log_{10}$ DNA copies/mL of BAL. Differences were then observed according to treatment. In the E2 group, marbofloxacin administration at T1 induced a drastic decrease in the bacterial load until euthanasia. At T2, one of the three E2 calves was negative, and all E2 calves were negative at the end of the experiment (T3). In groups L2 and L10, which were treated 33-35 hours later, the bacterial load increased in a similar manner as the control group until T2 of late treatment. Then, the bacterial load decreased in both groups, and this decrease appeared to be higher in the L₁₀ group treated with 10 mg/kg marbofloxacin. At T3 of euthanasia, only one L10 calf exhibited positive BAL ($5.6 \log_{10}$ DNA copies/mL), whereas all the three L2 calves were positive, with loads ranging from 3.6 to $3.7 \log_{10}$ DNA copies/mL.

The mean *M. haemolytica* DNA loads were significantly different between the CON group and the E2, L2, L10 groups at T3, between E2 and L2 at T3 and between E2 and L10 at T2 (Fig. 1a). In addition, ABS scores in BAL indicated significant differences between the CON and the E2 and L2 groups and between the E2 and L2 groups (Fig 1b).

4.5.2 Comparisons of *M. haemolytica* DNA loads in all included calves at T3 of euthanasia

To further investigate the PCR results, we tested all the 22 included calves for the presence of *M. haemolytica* in BAL and in post-mortem tissue samples at T3 of euthanasia. The mean DNA loads in BAL were 5.8, 0, 2.3 and $1.2 \log_{10}$ DNA copies/mL for calves in the CON, E2, L2 and L10 groups, respectively, with 4 of 4, 0 of 6, 3 of 6 and 1 of 6 positive calves in each respective group.

In parallel, 4 of 4, 2 of 6, 5 of 6 and 4 of 6 calves in the CON, E2, L2 and L10 groups, respectively, were positive for *M. haemolytica* in at least one of the 5 respiratory tissues (right and left cranial lobes, accessory and cardiac lobes, tracheobronchial lymphatic node) tested in each calf. Large differences were observed when considering the number of positive samples per calf and per group (Fig. 2). In the E2 group, only the intermediate lobe of one calf and the left cranial lobe of another calf were positive, with moderate titers of 3.8 and $3.9 \log_{10}$ DNA copies/100 mg. In contrast, 80% of the tissue samples of the CON group were positive, whereas the L2 and L10 groups similarly had 37% of tissue samples as positive (Fig. 2).



	CON/E2	CON/L2	CON/L10	E2/L2	E2/L10	L2/L10
Right cranial lobe	**	ns	ns	ns	ns	ns
Left cranial lobe	*	ns	ns	ns	ns	ns
Cardiac lobe	**	*	ns	ns	ns	ns
Accessory lobe	*	ns	*	ns	ns	ns
Tracheobronchial lymphatic node	*	ns	ns	ns	ns	ns

Figure 4-2 : Mean titers of *M. haemolytica* DNA copies (with standard deviations) in respiratory post-mortem tissues of calves not treated (■), treated with 2 mg/kg marbofloxacin at 4 h after inclusion (E2, □), or 2 mg/kg (L2, ▨) or 10 mg/kg (L10, ▩) marbofloxacin at 36 h after inclusion. Significant differences are shown in the table: * p<0.05; ** p<0.01.

In the CON group, high DNA individual titers, ranging between 4.6 to 8.2 log₁₀ DNA copies/100 mg, were detected in positive samples (Fig. 2). The situation was intermediate in the L2 and L10 groups, with mean loads ranging from 0.7 to 3.2 log₁₀ DNA copies/100 mg, depending on the type of tissue. The mean *M. haemolytica* DNA loads in each tissue samples (Fig. 2) also indicated significant differences between the CON and E2 group, despite large intra-group variability. To confirm the results obtained by qPCR in tissue samples, a direct bacterial culture and titration was performed on the right cranial lobe of the lungs (Table 1). In the E2 group, all samples collected for bacterial culture remained negative, even the two samples that were slightly positive with PCR. For the CON, L2 and L10 groups, the *M. haemolytica* counts globally mimicked those obtained by PCR, except for two calves in the L2 group for which culture was slightly positive but not with PCR analysis (Table 1).

Tableau 4-1 : Main individual results of clinical and bacteriological examination after *M. haemolytica* challenge for untreated calves (CON) or calves treated with 2 mg/kg (E2) marbofloxacin at 4 h after inclusion or 2 mg/kg (L2) or 10 mg/kg (L10) marbofloxacin at 36 h after inclusion.

Treatment group and calf		Total cranio ventral percentage lung consolidation	Percentage of lung lobes with microscopic lesions	Highest individual clinical score	Accumulated clinical score	<i>M. haemolytica</i> log 10 CFU/g in right apical lobe	<i>M. haemolytica</i> log 10 DNA copies/g in right apical lobe	<i>M. haemolytica</i> log 10 DNA copies/mL in BAL at necropsy	
C	4254	88	75	10	34,8	10.5	9.2	8.6	
C	4269	0	0	3	11,8	3.0	6.0	7.0	
C	4310	51	87.5	10	24,8	10.0	6.7	7.9	died at 56h
C	4312	12	25	6	20	4.0	7.7	5.5	
E2	4253	0	0	3	5,5	0.0	0.0	0.0	
E2	4261	0	0	6	9,5	0.0	0.0	0.0	
E2	4276	0	0	9	11,5	0.0	0.0	0.0	
E2	4284	0	0	3	6,7	.0	0.0	0.0	
E2	4298	17	25	5	5,7	0.0	0.0	0.0	
E2	4321	0	0	5	8,4	contamination	0.0	0.0	
L2	4263	0	0	8	17,5	3.2	0.0	0.0	
L2	4280	55	87.5	12	28,7	8.8	9.4	3.7	
L2	4295	0	12.5	6	11,2	0.0	5.3	3.7	
L2	4311	11	25	5	9,7	3.7	2.0	4.0	
L2	4316	0	0	6	8,4	2.7	2.0	1.2	
L2	4319	0	25	8	10,1	0.0	0.0	0.0	
L10	4275	0	0	6	10,3	3.2	5.1	5.7	
L10	4292	4	37.5	9	14,5	contamination	4.0	0.0	
L10	4306	0	0	10	13,9	0.0	0.0	0.0	
L10	4307	0	0	5	8,1	0.0	3.5	0.0	
L10	4309	3	25	11	19,9	3.0	5.3	4.1	
L10	4313	0	12.5	8	11,9	0.0	0.0	0.0	

4.5.3 Clinical responses of calves to *M. haemolytica* infection

To determine whether bacterial growth was associated with disease evolution, we assessed calves for clinical signs and lesions over time. All calves were healthy prior to and immediately after inoculation. At this time, the mean rectal temperature was 38.8 +/- 0.4°C. Twenty-two of 32 calves were selected based on rectal temperature elevation. These calves were randomly allocated into one of four groups just after receiving the respective treatment.

Rectal temperature of the included calves peaked between 3 to 9 h after challenge. Mean rectal temperature peaked at 40.2°C at the time of inclusion in all groups. Then, rectal temperature decreased over time in all groups. Rectal temperature decreased to baseline within 6 h after early treatment in E2 group and within 12 h after late treatment in the L2 and L10 groups. In the non-treated animals, rectal temperature remained above the temperature of the treated groups at each time point, indicating a significant difference between E2 calves and non-treated calves at T2 (data not shown).

Clinical signs started at 6+/- 3 h and peaked between 24 and 40 h after inoculation for most calves. After peak, clinical signs of CON calves slightly decreased throughout the course of infection. In the other groups, clinical signs were very similar to those observed in the CON group until each treatment. Consequently, for clinical score evaluation, all calves were considered as a unique group until marbofloxacin administration, as shown in Fig. 3a. To summarize, the clinical signs were moderate in most of calves and severe in two CON calves over time and one L2 calf and one L10 calf prior to treatment. In the CON group, one of the two calves with severe disease was euthanized at 56 hours after infection for ethical reasons.

Moderate signs included hyperthermia, tachypnea and dyspnea with labored breathing. In severe forms, reduced appetite, depression, recumbence and severe dyspnea with labored breathing and surrounding lung sounds were observed.

The mean clinical scores indicated that marbofloxacin injections were followed by a rapid (within 24h) clinical improvement of calves, regardless of early or late treatment (Fig. 3a). Twenty-four hours after each respective treatment, 4 of 6 E2 and L2 calves and all of the L10 calves presented a clinical score less than 4 (Table 1). Forty-eight hours after treatment up to the end of the experiment, clinical scores remained less than 4 for all calves in the treated groups. Significant differences were observed between the non-treated animals and the E2 group at 24 hours, between

the CON group and E2, L2 and L10 groups at 48 and 72 hours after infection, and finally between the CON group and the E2 and L10 groups at 96 hours post infection (Fig 3a).

The accumulated clinical score (ACS) was evaluated for each calf of each group from the time of infection until the time of euthanasia (T3). The mean ACS for each group indicated strong differences between the treated and non-treated groups, with significant differences only between the E2 and CON groups (Fig. 3b).

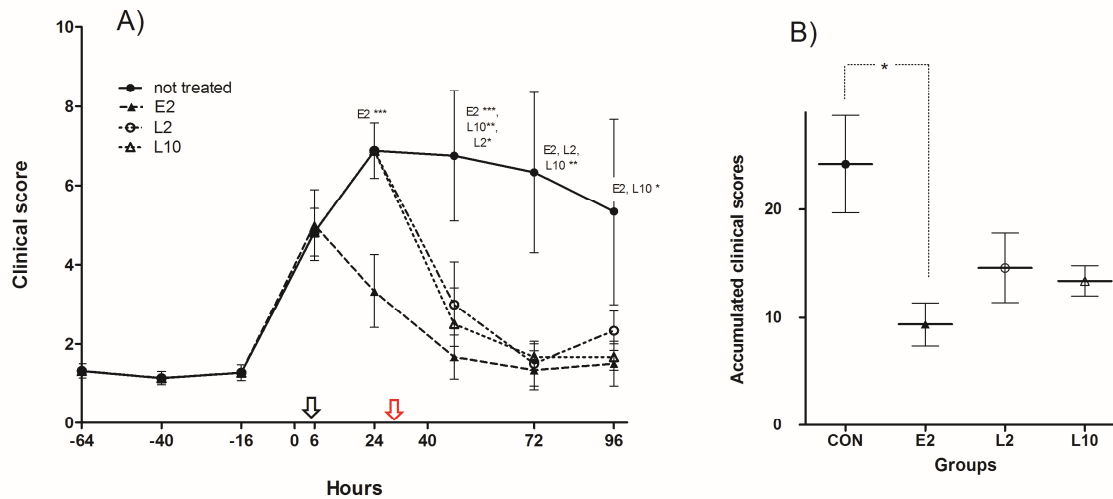


Figure 4-3 : Mean clinical scores (A) and mean accumulated clinical scores (B) of calves inoculated with *M. haemolytica* and treated with 2 mg/kg (E2) marbofloxacin at 4 h after inclusion (black arrow) or 2 mg/kg (L2) or 10 mg/kg (L10) marbofloxacin at 36 h after inclusion (red arrow). For (A), calves remained in the control group until the time of treatment. For (B), individual ACS were determined as the area under the curve of clinical scores collected at -16, 6, 24, 40, 72 and 96 hours (Graph Pad software, La Jolla, USA). Significant differences: * p<0.05; ** p <0.01

4.5.4 Lung lesions

Lung lesions were primarily observed in all calves in the CON group. Lung damage was observed in the apical lobes and was typical of acute infection with *M. haemolytica*, including a high tissue consolidation and a dark-red to grey-red lobular coloration with foci of necrosis. Lung lesions were also frequently associated with pleuresia and fibrin deposits. The mean percentage of cranioventral lung consolidation was 38%, 5%, 11% and 1% in the CON, E2, L2 and L10 groups, respectively. However, the extension of the gross lesions varied greatly between animals. In the CON group, two calves exhibited severe lesions on both cranial and caudal lobes, one calf exhibited lesions on cranial lobes only, and one calf presented only very restricted lesions. In all groups, calves with the most severe lung lesions also presented the highest individual clinical score and high *M. haemolytica* content in the lungs (Table 1).

At histopathology, 75%, 16.7%, 66.7% and 50% of CON, E2, L2 and L10 calves, respectively, had microscopic lesions in at least one lobe of the lung. Considering the extension of the microscopic lesions, 46.9%, 4.2%, 22.9% and 12.5% of the lobes were positive in the CON, E2, L2 and L10 groups, respectively.

In the CON group, microscopic lesions were located in all lung lobes for 2 of 4 calves and only in cranial lobes only of the two other animals. Lesions were specific to an acute severe bronchopneumonia and characterized by an hemorrhagic alveolitis with large fibrinous deposits and major infiltration of leucocytes (Fig. 4b), foci of necrosis surrounded by oat cells and altered neutrophils (Fig. 4c), interlobular edema and thrombosis (Fig. 4c), moderate quantities of mucus in the lumen of bronchioles and leucofibrinous pleuresia (score of 2). This type of lesion (score of two) was not observed for E2 calves but was observed to a small extent in 3 of the 6 calves in the L2 and L10 groups. In addition, histopathological lesions of sub-acute bronchopneumonia (score of 1) were also observed but with less frequency in only one calf in each of the four included groups. In this case, lesions were characterized by a fibrinous and macrophagic alveolitis associated with small abscesses or pyogranulomas of the lung parenchyma (Fig. 4d).

The mean histopathological score for each group is shown in Fig. 4e, with strong but no significant differences between the treated and not treated calves, except between the E2 and CON groups. This mean score was correlated with the total cranioventral percentage of lobe consolidation (Fig. 4f), except for one E2 calf that exhibited a low histopathological score, despite moderate consolidation.

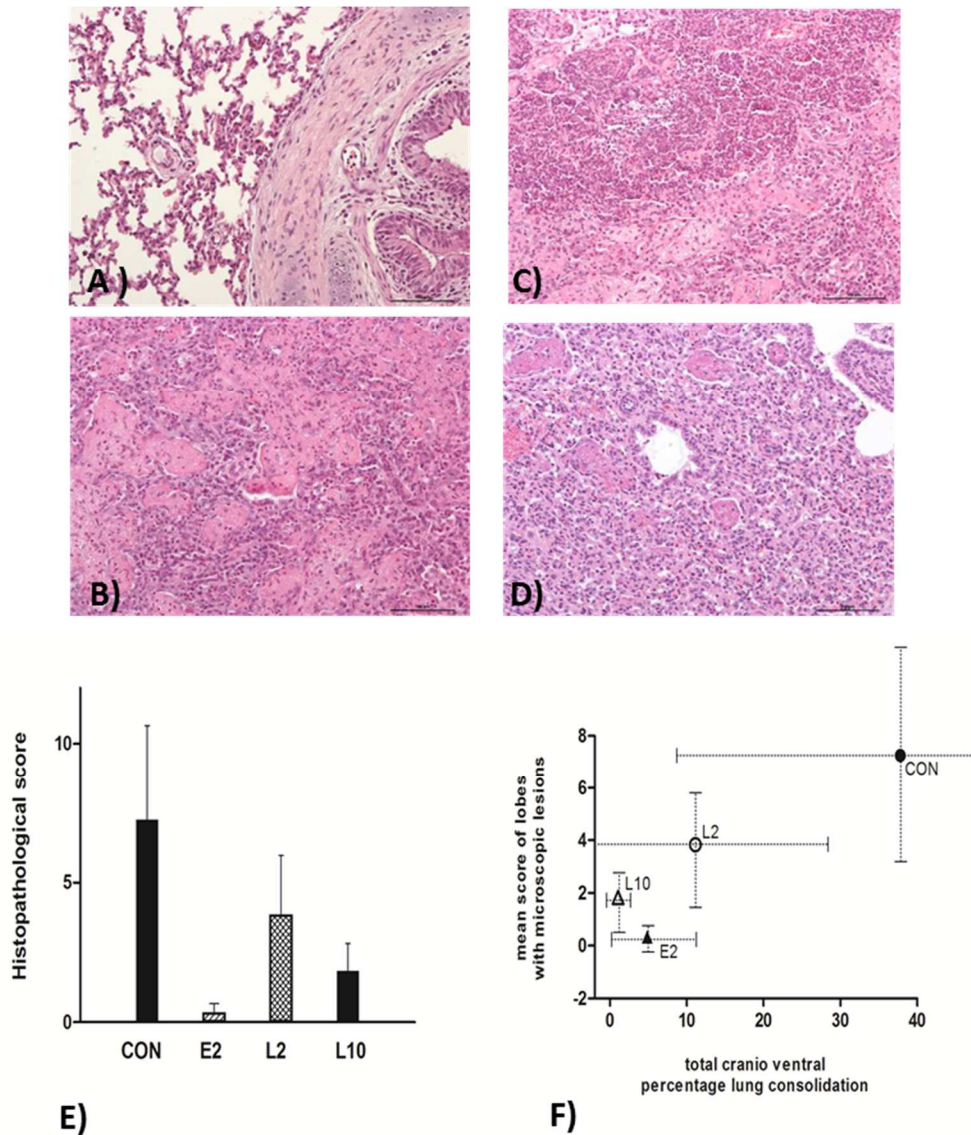


Figure 4-4 : Microscopic examination. **4A**: Normal lung microscopic examination (hemalun & eosin, x200). **4B**: Lesions of hemorrhagic alveolitis, large fibrinous deposits and major infiltration of leucocytes, score of 2 (hemalun & eosin, x200). **4C**: oat cells and altered neutrophils, score of 2 (hemalun & eosin, x200). **4D**: Macrophagic alveolitis, score of 1 (hemalun & eosin, x200). **4E**: Mean histopathological score (+/- sd) of calves challenged with *M. haemolytica* and treated with 2 or 10 mg/kg marbofloxacin at the early or late stages of infection. **4F**: Correlation between the total cranioventral percentage of lobe consolidation (gross lesions, x axis) and number of lobes with microscopic lesions (y-axis).

4.6 Discussion

The objective of this study was to assess the efficacy of a decreased marbofloxacin regimen when administered at early-time of infection, on bacterial burden and clinical outcomes in calves infected with *M. haemolytica*. To fulfill this objective, we first developed an experimental model for the detection and treatment of *M. haemolytica* mimicking field conditions. BRD treatments are frequently administered after visual appraisal of clinical respiratory signs. However, because these signs often occur late in the disease course (Schaefer et al., 2007), hyperthermia is increasingly frequently used to promptly detect and treat BRD in young cattle. In a French field study conducted in young bulls, Timsit et al. (Timsit et al., 2011) demonstrated that episodes of hyperthermia (>39.7°C) preceded the onset of nasal discharge, abnormal lung sounds and depression by a mean of 19, 38.8 and 51.2 hours, respectively. To be consistent with these field observations, we delayed early and late treatments by 30 hours. Moreover, we included calves for early treatments based on an increase in rectal temperature of 1°C compared to their basal rectal temperature. This 1°C implementation matches with the temperature threshold commonly used for treatment and previously reported as an early sign of BRD (Galyean et al., 1995; Schaefer et al., 2007; Timsit et al., 2011). The choice of the two doses of marbofloxacin was based on a PK/PD evaluation of antimicrobial efficacy previously published for *M. haemolytica* (Potter et al., 2013; Valle et al., 2012). The high dose of 10 mg/kg matched with the current recommended dose of marbofloxacin, as mentioned in the commercial product (FORCYL®) with the indication for treatment of BRD. The low dose was the lowest dose ensuring bactericidal efficacy in vitro on a targeted low inoculum of *M. haemolytica* (G. Lhermie, F. El Garch, A. A. Ferran, A. Bousquet-Mélou, submitted for publication).

To our knowledge, this is the first study assessing the kinetics of *M. haemolytica* loads in the lower respiratory tract of calves for more than 5 consecutive days. These assessments were performed using a commercialized qPCR kit that is increasingly used to diagnose *M. haemolytica* in the field (Pelletier, 2013). Our results in the control group (Fig. 1) indicated a continuous increase in bacterial loads in the BAL from the start to the end of the experiment, confirming our model of infection. Another study assessed *M. haemolytica* growth during the 48 h after infection with a similar inoculum load (10^8 CFU/calf) and observed an increased bacterial count in bronchial secretions until 18 h post-infection, with a plateau of 10^7 CFU/mL (Sarasola et al., 2002). Differences of bacteria kinetics between the two studies may be due to the method of quantification because part of the DNA for PCR titration may have been obtained from bacteria killed by the immune response of calves. Another possibility is virulence difference of the *M. haemolytica* A1

strain used in this study, which was previously confirmed to be highly replicative and pathogenic in calves.

Our model of *M. haemolytica* infection showed that a single early treatment with a single dose of 2 mg/kg marbofloxacin led to the rapid elimination of bacteria in all infected calves between 30 and 116 hours after injection. All E2 calves were negative for *M. haemolytica* detection in BAL at the end of the experiment. Only 2 out of 30 tissues samples contained low DNA quantities (<4 log₁₀ copies/100 mg). The rapid clearance of *M. haemolytica* after early treatment with a lower marbofloxacin dose than that currently recommended (10 mg/kg) might be explained by the relatively low loads of bacteria observed in BALs at T1, suggesting that the required regimen to obtain bacterial elimination is dependent (partly or mostly) on the size of the inoculum at the time of treatment. These results are supported by those obtained in various in vitro and in vivo studies conducted with fluoroquinolones, stressing the influence of bacterial cell density on the efficacy of these antibiotics (Ferran et al., 2007; Kesteman et al., 2009; Mizunaga et al., 2005; Udekwu et al., 2009). Moreover, in a recent experimental study testing bactericidal efficacy of marbofloxacin in a mouse-lung infection model using either *M. haemolytica* or *P. multocida* strains with close marbofloxacin MICs, we observed that the administration of a lower dose of marbofloxacin (given 10 h after inoculation) led to the total eradication of a bacterial load of 10⁸ CFU/lung of *M. haemolytica*. In contrast, a similar dose completely failed to achieve bacterial elimination of a bacterial load of 10⁸ CFU/lung of *P. multocida*. (G. Lhermie, F. El Garch, P.L. Toutain, A.A. Ferran, A. Bousquet-Mélou, submitted for publication). These results indicated that marbofloxacin was much more efficacious against *M. haemolytica* than *P. multocida*, in a mouse model which is not a natural host of these pulmonary pathogens. In the natural host model tested in the present study, which is particularly sensitive to the virulence factors expressed by *Mannheimia haemolytica* such as leukotoxin (Apley, 1997; Van Donkersgoed et al., 1993; Zecchinon et al., 2005), we confirmed the ability of an early marbofloxacin treatment to produce rapid and complete microbiological cure.

Compared with the early treatment, calves treated 30 hours later with the same 2 mg/kg dose of antibiotic displayed different pattern. Significant differences in DNA titers were found between the E2 and L2 groups in BALs at T3 and in accumulated bacterial loads. Large differences in *M. haemolytica* DNA titers, although not significant, were also observed between the two groups considering both the number of calves with positive lung samples and the total number of positive tissues per calf. The situation appears to be slightly different when calves were treated later but with a high 10 mg/kg dose of marbofloxacin. No significant differences were observed between

the E2 and L10 groups at T3 of euthanasia. In the L10 group, *M. haemolytica* was detected in 10 of 30 respiratory samples but in only 2 of 6 tested calves. Further, even if bacterial loads were similar in the L2 and L10 calves just prior to treatment (T2), only one L10 calf presented moderate bacteria DNA titers in BAL three days after treatment (T3), whereas all the three L2 calves remained positive, suggesting that an increased marbofloxacin dosage from 2 to 10 mg/kg was associated with higher bacterial elimination when treatments area initiated later. This result is also supported by the decrease in mean DNA titers shown in Figure 1, suggesting that clearance of bacteria was faster for the L10 than L2 group and was likely similar between the L10 and E2 groups. These results are in agreement with previous works, confirming that fluoroquinolones display a concentration-dependent killing mechanism of *M. haemolytica* (Illambas et al., 2013; Sarasola et al., 2002). Finally, our results simultaneously confirm the concentration-dependent behavior of fluoroquinolones against Gram-negative bacteria for a given bacterial load, and suggests that the size of the bacterial load at the time of treatment influences the range of exposure magnitude required to obtain bacterial eradication.

Taken together, these results highlight the advantage of early treatments that allow using a lower dose of antibiotic to quickly resolve *M. haemolytica* infection in the lower respiratory tract of calves. One major question for livestock professionals is the impact of such early treatment on animal health and also human health by limiting antibiotic consumption. In this study, we only focused on animal health by assessing clinical signs and lesions of infected and treated calves. In the control group, rectal temperature and mean clinical score peaked within 3-12 h and 24-40 h following challenge, respectively, reached a plateau, and then slightly decreased until the end of the experiment. This mimics the precedence of hyperthermia as observed in field conditions and supported in numerous respiratory challenge models (Burciaga-Robles et al., 2010; Crouch et al., 2012; Fajt et al., 2004; Forbes et al., 2011; Hanzlicek et al., 2010; Rose-Dye et al., 2011). In our challenge model reproducing moderate to severe disease, early or late treatments with marbofloxacin clearly induced recovery of all calves in less than 24 hours. These results are supported by those obtained in field studies that have monitored the effects of marbofloxacin on rectal temperature and clinical status of animals naturally infected with various respiratory pathogens (Grandemange, 2012; Thomas et al., 2001). Total accumulated clinical scores showed major differences between the control and E2, L2 and L10 groups; however, these differences were only significant between the E2 and control groups (Fig. 3b). The main explanations may be the variability of individual response in the challenge model or more likely, the delay of treatment, as clinical scores decreased similarly in all treated groups within 24 h after antibiotic injection, with significant differences compared with the control group (Fig. 3a).

Our results also suggest that early treatment may prevent pulmonary lesions. Whatever the antibiotic dosage, treatment led to a low frequency of lung lesions, but significant differences for histopathological scores were only observed between the E2 and control groups. Further, calves treated earlier presented a lower percentage of cranioventral lung consolidation, a lower number of lobes with macroscopic and microscopic lesions, and lower histopathological scores compared with calves treated 30 hours later. Again, these results could be associated with rapid elimination of bacterial burden, avoiding bacterial growth and thus the onset of pulmonary damage. We also observed that lesion severity was correlated with bacterial load in the lungs. Our results agree with those reported in another experimental bovine respiratory disease model, in which a positive relationship between the severity of clinical signs, cumulative clinical scores and extension of pulmonary macroscopic and microscopic lesions was observed (Forbes et al., 2011). However, it is unclear why, despite increasing high qPCR titers in the lungs, we did not observe severe disease with extensive pulmonary lesions in some of the non-treated animals. This observation suggests that implementation of on-field therapy based on early diagnosis of illness and using decreased antimicrobial regimen may require specific diagnosis tools to measure bacterial load and, if possible, a precise monitoring of markers correlated with infection stage.

To conclude, to our knowledge, this is the first time that a decreased antimicrobial regimen administered at early time of infection and targeting a low bacterial load demonstrated efficacy in a bovine natural host experimental model. The responses to the treatments, in terms of bacterial elimination, pulmonary lesions, and clinical recovery, were similar between the lower dose (low inoculum-adjusted) administered at an early time of infection and the higher dose (high inoculum-adjusted) given at a later time of infection. Altogether, our results are proof of principle that there is a place for the optimization of antibiotic doses in food-producing animals, provided strict conditions of early diagnosis of illness that allows combining the cure of bacterial infections with the reduction of antibiotic consumption. Reminding that such reduction of antibiotic consumption is one of the main factors allowing prevention/mitigation of antimicrobial resistance of human health concerns, the present strategy would merit to be evaluated in field conditions.

4.7 References

- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., 1999, The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 1, 639-644.
- Ackermann, M.R., Brogden, K.A., 2000, Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. *Microbes Infect* 2, 1079-1088.
- Agriculture, U.S.D.o. 2013. Types and costs of respiratory disease treatments in the U.S. feedlots, (Ed.), I.U.A.V., National Animal Health Monitoring System, F., CO., C., eds., p. 2.
- Amrine, D.E., White, B.J., Larson, R.L., Mosier, D.A., 2014, Pulmonary lesions and clinical disease response to *Mannheimia haemolytica* challenge 10 days following administration of tildipirosin or tulathromycin. *J Anim Sci* 92, 311-319.
- Angulo, F.J., Baker, N.L., Olsen, S.J., Anderson, A., Barrett, T.J., 2004, Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis* 15, 78-85.
- Apley, M., 1997, Antimicrobial therapy of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13, 549-574.
- Burciaga-Robles, L.O., Step, D.L., Krehbiel, C.R., Holland, B.P., Richards, C.J., Montelongo, M.A., Confer, A.W., Fulton, R.W., 2010, Effects of exposure to calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus type 1b and subsequent infection with *Mannheimia haemolytica* on clinical signs and immune variables: model for bovine respiratory disease via viral and bacterial interaction. *J Anim Sci* 88, 2166-2178.
- Bywater, R.J., 2004, Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 361-363.
- CLSI, 2009, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Eighth Edition. Document M7-A8 29-2.
- Courvalin, P., 2005, Antimicrobial Drug Resistance: "Prediction Is Very Difficult, Especially about the Future". *Emerg Infect Dis* 11, 1503-1506.
- Courvalin, P., 2008, Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med* 264, 4-16.
- Crouch, C.F., LaFleur, R., Ramage, C., Reddick, D., Murray, J., Donachie, W., Francis, M.J., 2012, Cross protection of a *Mannheimia haemolytica* A1 Lkt-/*Pasteurella multocida* DeltahyaE bovine respiratory disease vaccine against experimental challenge with *Mannheimia haemolytica* A6 in calves. *Vaccine* 30, 2320-2328.

- Dagleish, M.P., Finlayson, J., Bayne, C., MacDonald, S., Sales, J., Hodgson, J.C., 2010, Characterization and time course of pulmonary lesions in calves after intratracheal infection with *Pasteurella multocida* A:3. *J Comp Pathol* 142, 157-169.
- Deplanche, M., Lemaire, M., Mirandette, C., Bonnet, M., Schelcher, F., Meyer, G., 2007, In vivo evidence for quasispecies distributions in the bovine respiratory syncytial virus genome. *J Gen Virol* 88, 1260-1265.
- Dowling, A., Hodgson, J.C., Schock, A., Donachie, W., Eckersall, P.D., McKendrick, I.J., 2002, Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3. *Res Vet Sci* 73, 37-44.
- Fajt, V.R., Apley, M.D., Brogden, K.A., Skogerboe, T.L., Shostrom, V.K., Chin, Y.L., 2004, Effect of danofloxacin and tilmicosin on body temperatures of beef calves with pneumonia experimentally induced by inoculation with *Mannheimia haemolytica*. *Am J Vet Res* 65, 610-615.
- Ferran, A., Dupouy, V., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2007, Influence of inoculum size on the selection of resistant mutants of *Escherichia coli* in relation to mutant prevention concentrations of marbofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 4163-4166.
- Ferran, A.A., Bibbal, D., Pellet, T., Laurentie, M., Gicquel-Bruneau, M., Sanders, P., Schneider, M., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2013, Pharmacokinetic/pharmacodynamic assessment of the effects of parenteral administration of a fluoroquinolone on the intestinal microbiota: comparison of bactericidal activity at the gut versus the systemic level in a pig model. *Int J Antimicrob Agents* 42, 429-435.
- Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2011, Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection. *Vet Microbiol* 148, 292-297.
- Forbes, A.B., Ramage, C., Sales, J., Baggott, D., Donachie, W., 2011, Determination of the duration of antibacterial efficacy following administration of gamithromycin using a bovine *Mannheimia haemolytica* challenge model. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 831-835.
- Fulton, R.W., 2009, Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Anim Health Res Rev* 10, 131-139.
- Galyean, M.L., Gunter, S.A., Malcolm-Callis, K.J., 1995, Effects of arrival medication with tilmicosin phosphate on health and performance of newly received beef cattle. *J Anim Sci* 73, 1219-1226.
- Grandemange, E., Fournel, S., Giboin, H., Woerhlé, F., 2012, Efficacy of a single injection of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *Revue Médecine Vétérinaire* 6, 287-294.

- Hanzlicek, G.A., White, B.J., Mosier, D., Renter, D.G., Anderson, D.E., 2010, Serial evaluation of physiologic, pathological, and behavioral changes related to disease progression of experimentally induced *Mannheimia haemolytica* pneumonia in postweaned calves. *Am J Vet Res* 71, 359-369.
- Heins, B.D., Nydam, D.V., Woolums, A.R., Berghaus, R.D., Overton, M.W., 2014, Comparative efficacy of enrofloxacin and tulathromycin for treatment of preweaning respiratory disease in dairy heifers. *J Dairy Sci* 97, 372-382.
- Illambas, J., Potter, T., Cheng, Z., Rycroft, A., Fishwick, J., Lees, P., 2013, Pharmacodynamics of marbofloxacin for calf pneumonia pathogens. *Res Vet Sci* 94, 675-681.
- Kesteman, A.S., Ferran, A.A., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Sanders, P., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009, Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4740-4748.
- Martinez, M.N., Papich, M.G., Drusano, G.L., 2012, Dosing regimen matters: the importance of early intervention and rapid attainment of the pharmacokinetic/pharmacodynamic target. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2795-2805.
- Mizunaga, S., Kamiyama, T., Fukuda, Y., Takahata, M., Mitsuyama, J., 2005, Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 56, 91-96.
- Nickell, J.S., White, B.J., 2010, Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26, 285-301.
- O'Connor, A.M., Coetzee, J.F., da Silva, N., Wang, C., 2013, A mixed treatment comparison meta-analysis of antibiotic treatments for bovine respiratory disease. *Prev Vet Med* 110, 77-87.
- Pelletier, C., 2013. Use of in-house multiplex real-time PCR for simultaneous diagnosis of six major respiratory pathogens in cattle: two years of experience in Burgundy. In: European Buiatrics forum, 27-29 Novembre, Marseille, France, p. 37.
- Potter, T., Illambas, J., Pelligand, L., Rycroft, A., Lees, P., 2013, Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and modelling of marbofloxacin in calves for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Vet J* 195, 53-58.
- Riffault, S., Meyer, G., Deplanche, M., Dubuquoy, C., Durand, G., Soulestin, M., Castagne, N., Bernard, J., Bernardet, P., Dubosclard, V., Bernex, F., Petit-Camurdan, A., Deville, S., Schwartz-Cornil, I., Eleouet, J.F., 2010, A new subunit vaccine based on nucleoprotein nanoparticles confers partial clinical and virological protection in calves against bovine respiratory syncytial virus. *Vaccine* 28, 3722-3734.

- Rose-Dye, T.K., Burciaga-Robles, L.O., Krehbiel, C.R., Step, D.L., Fulton, R.W., Confer, A.W., Richards, C.J., 2011, Rumen temperature change monitored with remote rumen temperature boluses after challenges with bovine viral diarrhoea virus and *Mannheimia haemolytica*. *J Anim Sci* 89, 1193-1200.
- Sarasola, P., Lees, P., AliAbadi, F.S., McKellar, Q.A., Donachie, W., Marr, K.A., Sunderland, S.J., Rowan, T.G., 2002, Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of danofloxacin administered by two dosing regimens in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3013-3019.
- Schaefer, A.L., Cook, N.J., Church, J.S., Basarab, J., Perry, B., Miller, C., Tong, A.K., 2007, The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Res Vet Sci* 83, 376-384.
- Thomas, E., Caldow, G.L., Borell, D., Davot, J.L., 2001, A field comparison of the efficacy and tolerance of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther* 24, 353-358.
- Timsit, E., Bareille, N., Seegers, H., Lehebel, A., Assie, S., 2011, Visually undetected fever episodes in newly received beef bulls at a fattening operation: occurrence, duration, and impact on performance. *J Anim Sci* 89, 4272-4280.
- Toutain, P.L., del Castillo, J.R., Bousquet-Melou, A., 2002, The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci* 73, 105-114.
- Udekwa, K.I., Parrish, N., Ankomah, P., Baquero, F., Levin, B.R., 2009, Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 63, 745-757.
- Valle, M., Schneider, M., Galland, D., Giboin, H., Woehrle, F., 2012, Pharmacokinetic and pharmacodynamic testing of marbofloxacin administered as a single injection for the treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther* 35, 519-528.
- Van Donkersgoed, J., Ribble, C.S., Boyer, L.G., Townsend, H.G., 1993, Epidemiological study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. *Can J Vet Res* 57, 247-254.
- Vasseur, M.V., Laurentie, M., Rolland, J.G., Perrin-Guyomard, A., Henri, J., Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2014, Low or high doses of cefquinome targeting low or high bacterial inocula cure *Klebsiella pneumoniae* lung infections but differentially impact the levels of antibiotic resistance in fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1744-1748.
- Zecchinon, L., Fett, T., Desmecht, D., 2005, How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res* 36, 133-156.

5. CHAPITRE 5. NOUVELLES PERSPECTIVES DE
TRAITEMENT DES MALADIES RESPIRATOIRES BOVINES :
EVALUATION TERRAIN DE LA CONSOMMATION
D'ANTIBIOTIQUES ET DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE
D'UN PROTOCOLE DE TRAITEMENT AJUSTE

Etude expérimentale n°3: **New perspective for treatment of bovine respiratory disease from a field evaluation of antimicrobial consumption and therapeutic efficacy using an adjusted protocol**

from G. Lhermie, AA. Ferran, F. El Garch, F. Woerhlé, C. Fouqué, G. Meyer, C. Belloc, PL. Toutain, A. Bousquet-Melou, H. Seegers and S. Assié

Soumission prévue au journal JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY le
15 septembre 2015

5.1 Résumé en français

L'antibiorésistance associée à l'usage vétérinaire des antibiotiques représente un risque potentiel pour la santé publique. Dans ce contexte, il apparaît crucial de promouvoir un usage prudent et raisonné des antibiotiques vétérinaires, qui passe par une diminution du nombre d'animaux traités inutilement, et par une optimisation des schémas thérapeutiques lorsque les traitements sont nécessaires. Il a été démontré sur un certain nombre de modèles animaux d'infections expérimentales qu'il était possible de réduire la dose antibiotique en cas d'administration en début de maladie, lorsque l'inoculum bactérien est de petite taille.

Nous avons mené une étude terrain pour évaluer au niveau collectif les performances d'un protocole de traitement précoce à dose diminuée de marbofloxacin dans le traitement des bronchopneumonies infectieuses (BPI) chez le jeune bovin (JB). La consommation antibiotique et l'efficacité des traitements de première intention ont été mesurées sur 195 JB, issus de 6 unités d'élevage. Une antibiothérapie systématique « longue action », en début d'étude, a été réalisée sur tous les animaux de 3 unités sur les 6 recrutées. Les incidences de traitement (TI) basées sur les doses journalières utilisées (used daily doses UDD), traduisant la consommation antibiotique, et l'exposition des JB aux antibiotiques ont été calculées. Les JB ont été alloués de manière aléatoire dans un des deux groupes expérimentaux E2 ou L10. Tous les JB du groupe E2 ont été équipés de thermobolus permettant un enregistrement en continu des températures ruminales individuelles. Les JB du groupe E2 ont reçu un traitement précoce de 2 mg/kg de marbofloxacin, administré sur la base d'une hyperthermie ruminale confirmée par un examen clinique mettant en évidence des signes légers de BPI. Les JB du groupe L10 ont reçu un traitement de 10 mg/kg de marbofloxacin, administré après détection clinique de signes de BPI par l'éleveur ou le vétérinaire en charge du suivi quotidien. En cas d'échec du traitement par la marbofloxacin (traitement de 1^{ère} intention) les animaux ont reçu un traitement de seconde intention à base de tulathromycine et florfenicol (tula-flor). Le nombre moyen de doses journalières de marbofloxacin utilisées pour 1000 JB exposés ($TI_{UDDmarbo}$) était de 16 dans le groupe E2 et de 43 dans le groupe L10. Le nombre moyen de doses journalières de traitement de 2^{ème} intention pour 1000 JB exposés ($TI_{UDDtula-flor}$) était de 25 dans le groupe E2 et de 3 dans le groupe L10. Au total, le nombre moyen de doses journalières utilisées pour 1000 JB exposés ($TI_{UDDtotal}$) était de 40 dans le groupe E2 et de 46 dans le groupe L10. La proportion d'animaux ayant reçu des traitements de première et seconde intention était plus importante (45 et 37%) dans le groupe E2 que dans le groupe L10 (25 et 7%). 97 et 100% des JB traités dans les groupes E2 et L10 étaient guéris à la fin de l'étude. Dans les

élevages ayant implémenté une antibiothérapie systématique, la quantité d'antibiotiques utilisée pour ce traitement représentait 90% de la quantité totale d'antibiotiques utilisée.

Au final, le protocole de traitement avec une dose antibiotique diminuée administrée sur la base d'une détection précoce des signes de BPI a permis, malgré une augmentation de l'incidence des traitements, de réduire globalement la quantité d'antibiotique utilisée, sans affecter son efficacité thérapeutique. Ces résultats mettent en évidence qu'il est possible de rationaliser de l'usage des antibiotiques dans des conditions terrain, afin de limiter leur consommation et leurs impacts potentiels sur la santé publique.

5.2 Abstract

Objectives

To evaluate antimicrobial consumption and therapeutic efficacy of an early treatment protocol with a decreased antimicrobial regimen in a field study with young bulls (YBs) presenting Bovine Respiratory Disease (BRD).

Methods

Antimicrobial consumption and first line treatment efficacy were assessed in 195 YBs. Treatment incidences (TI) based on used daily doses (UDD), representing antimicrobial consumption, and overall exposure of YBs to antimicrobials treatments were calculated. The YBs were randomly assigned to one of two experiment groups Early 2 (E2) and Late 10 (L10) groups, based on early (E) or late (L) BRD detection and on first line marbofloxacin regimen (2 or 10 mg/kg).

Results

The mean values of sum TIUDD marbo and TIUDD tula-flor were 40 and 46 in groups E2 and L10, respectively. The mean number of curative treatment per YB at risk was 1.1 in E2, and 0.9 in L10 groups. These values were strongly influenced by the recourse to a systematic antimicrobial treatment, and the dosage regimen of marbofloxacin. In E2 groups, the proportion of 1st and 2nd line treatments were higher (respectively 45 and 37%) than in L10 (25 and 7%). 97% and 100% of YBs treated in E2 and in L10 groups were finally cured.

Conclusions

Our results suggest that the combination of an early detection of disease with lower antimicrobial regimen reduces drug consumption at the herd level without affecting treatment efficacy. Such findings evidence the possible rationalisation of antimicrobial use under field conditions, to limit impact on public health.

Key words: defined daily dose; decreased regimen; early treatment; fluoroquinolone; cattle

5.3 Introduction

Antimicrobial resistance is a major global public health concern in human and veterinary medicine (Laxminarayan et al., 2013). Exposure of animals to antimicrobials has been shown to lead to the selection of resistant pathogenic and commensal bacteria, under various conditions of usage of antimicrobials (Agerso and Aarestrup, 2013; Bywater, 2004; McEwen and Fedorka-Cray, 2002; van Loo et al., 2007). Direct or indirect transfer via the food chain or the environment of resistant bacteria or resistance genes between animals exposed to antimicrobials and humans represents a potential hazard for human health (Heuer et al., 2009; Madec et al., 2012; Singer et al., 2003; van Loo et al., 2007; Vieira et al., 2011; Wang et al., 2012). In this context, crucial issues are to decrease the number of animals unnecessarily treated, to use “as little as possible, as much as necessary” antimicrobials when they are needed, in order to maintain their efficacy (Laxminarayan, 2014).

In food producing animals, the treatment of bovine respiratory diseases (BRD) represents one of the major uses of antimicrobials (Cusack et al., 2003; Fulton, 2009). Even if various pathogens such as viruses, bacteria and parasites have been identified as aetiological agents of BRD, the high prevalence of bacteria as involved pathogen, the frequent association between bacteria and viruses, and the absence of pathogen identification in field conditions, lead to a routine use of antimicrobials to control BRD (Assie et al., 2009; Fulton et al., 2009). Current practice of treatment of BRD consists in treating with long acting antimicrobials, early on, the entire cohort of animals in which only a few express clinical signs of BRD (Apley, 1997; Nickell and White, 2010). The rationale of this practice is based on the hypothesis that for one animal presenting clinical infection in the cohort, others animals are subclinically infected (Nickell and White, 2010). The advantages of this systematic strategy are the control of the infection dissemination and a good survival rate with regards to the group. It also has the disadvantage of subjecting a potentially large proportion of animals destined to human consumption to antimicrobials when they didn't require to. The second therapeutic approach to treat BRD focuses on treating only the animals presenting clinical signs of illness (Heins et al., 2014; Hoar et al., 1998; O'Connor et al., 2013). This approach limits the number of animals exposed to antimicrobials. However, it is usually seen as the “late approach”, and delay in treatment initiation may impact animal welfare, as the clinical signs possibly reflect extensive pulmonary damages which had time to develop prior treatment (Fulton et al., 2009). Furthermore, late intervention leads to treat high bacteria inocula, constituting a risk

of therapeutic failure and increasing the risk of emergence of resistant bacteria (Ferran et al., 2011; Kesteman et al., 2009). Therefore in the late treatment, high dosages of antimicrobials are generally administered to achieve bacterial cure.

Several studies in both human and veterinary medicine demonstrated that efficacious antimicrobial dosage regimen could be decreased if it is given at an early stage of the disease, when the infectious bacterial load is low (Ferran et al., 2011; Kesteman et al., 2009; Mizunaga et al., 2005; Udekwu et al., 2009). In an experimental infectious model of bovine lung infection, it has been shown that a fivefold decreased dose compared to the labelled dose of marbofloxacin, a fluoroquinolone extensively used for the treatment of respiratory disease, was sufficient for eradication of a low bacterial inoculum at early stage of infection, within hours following inoculation (Guillaume Lhermie, Aude Ferran, Sébastien Assié, Hervé Cassard, Farid El Garch, Marc Schneider, Frédérique Woerhlé, Diane Pacalin, Maxence Delverdier, Alain Bousquet-Melou, Gilles Meyer, unpublished results). However in field conditions, the lack of diagnostics tools allowing to quickly identify the pathogen and the bacterial load constitutes a major barrier to implement such treatment strategy with decreased regimen. An alternative could be to monitor early signs of illness, such as increase in core body temperature, which has been demonstrated to appear before clinical signs (Timsit et al., 2011a; Timsit et al., 2011b). A reduction in antimicrobial use could thus be achieved combining appropriate doses of antimicrobial with early detection of illness. To our knowledge, no field study in veterinary medicine aimed to evaluate the accuracy of such strategy of antimicrobial use.

Therefore, the objective of our study was to assess in a field clinical trial the impact of a decreased antimicrobial therapy at early stage of illness on antimicrobial consumption and its therapeutic relevance, compared to the traditional late high dosage administration of antimicrobials.

5.4 Material and methods

5.4.1 Study design

The study was conducted in western France from December 2014 to March 2015. A total of 195 ruminant Young Bulls (YBs) Charolais, Limousin and Rouge des Prés, aged between 7 and 10 months with an average body weight of 299 kg were recruited in 6 commercial fattening units. All the YBs included in the study were tested for absence of Bovine Viral Diarrhea virus antibodies and significant increase through the study period (LSIVet™ Ruminant BVD/BD p80-Serum, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France). Before their arrival at the fattening unit, YBs were

transported over a distance less than 500 km from their birth farm to market auction place. Blood samples were collected and YBs were given an anthelmintic treatment (moxidectine, 500 µg/kg, Pour on). YBs were also administered orally a reticulo-rumen temperature bolus (San'phone, Medria SAS, Chateaugiron, France). The choice of implementing vaccination program at the auction market place was left to the farmer. YBs were then transported by truck for travel distance less than 50 km in the fattening unit. At the time of arrival, calves were separated in barns containing 7 to 12 animals. In the six fattening units, each barn was randomly assigned to one of the two experiment groups E2 and L10, characterized by the different methods of detection of illness and treatment regimens. YBs were housed on straw-bedded and had free access to water and food. Follow-up of the YBs started on the first day on feed and lasted 30 days.

5.4.2 Detection of illness

In the E2 group, reticulo-rumen temperatures of YBs were continuously recorded during 30 days after the arrival at the fattening unit, as described by Timsit et al (Timsit et al., 2011a). Briefly, the reticulo-rumen temperature was recorded every 5 minutes by the temperature bolus and sent to a server via a base station. Data were extracted and analyzed by the program provided by the manufacturer, and finally represented graphically by a curve showing reticulo-ruminal temperature as function of time. The curves were observed three times daily by a veterinarian. If an increase of ruminal temperature over a threshold of 40.2°C and persisting more than 12h was observed, physical examination of the suspected animal was performed within 12h. Upon physical examination, YB with a rectal temperature $\geq 39.7^{\circ}\text{C}$ and/or slight clinical signs of illness was considered as early detected. A YB with a rectal temperature $< 39.7^{\circ}\text{C}$ at the time of physical examination was considered as not detected.

In the L10 group, inclusion of the animals was only based on visual inspection of undisturbed animals followed by clinical examination in case of discomfort signs. A validated grid developed to perform visual inspection was used (Torres et al., 2013). Briefly, a YB presenting moderate or severe clinical signs of illness after physical examination such as moderate or severe signs of depression or respiratory disorders such as nasal discharge, cough, and increased respiratory efforts at visual inspection was considered as late detected if also presenting a rectal temperature $\geq 39.7^{\circ}\text{C}$.

5.4.3 Clinical follow up

In case of detection of disease, rectal temperature of the YB was recorded and a complete clinical examination was performed at the time of 1st line treatment (day 0) and at day 1, 2, 3, 7, 10, 21 after treatment. YBs were monitored using a scoring system adapted from Dowling (Dowling et al., 2002). Scores were assigned as follows: demeanour from 0 to 3 (normal, dull, depressed, recumbent); rectal temperature from 0 to 2 (< 39.5, 39.5-40.5, > 40.5) ; respiratory rate from 0 to 3 (< 45, 45-60, 60-90, > 90); heart rate from 0 to 2 (< 80, 80-100, > 100) ; nasal discharge from 0 to 3 (absent, mild, moderate, profuse); respiration from 0 to 2 (normal, increased effort, laboured); appetite from 0 to 2 (normal, decrease, anorexic). The Clinical Score (CS) was calculated daily for each calf by adding the values given for each parameter.

At day 1, 2, and 3, YBs presenting an increase of their CS compared to d0 or an increase >0.5°C of their rectal temperature measured at d0 were given a second line treatment. From d4 to the end of the study, a YB already treated presenting moderate to severe clinical signs of BRD was also given a second line treatment. If no clinical improvement was observed 2 days after the administration of the 2nd line treatment, a 3rd line treatment was given to the YB.

5.4.4 Antimicrobial treatments

5.4.4.1 Systematic antimicrobial treatments

The choice of implementing a systematic antimicrobial treatment before entering the fattening unit was left to the farmer. When given, YBs received a single injection of 4 mg/kg body weight tildipirosin by intramuscular (im) route at the auction market place.

5.4.4.2 1st line treatments

In the E2 group, animals identified after clinical examination as early detected were given immediately a single intramuscular dose of 2 mg/kg marbofloxacin (Marbocyl ®, Vetoquinol, Lure, France), and a single intramuscular dose of 2 mg/kg tolfenamic acid, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) used in veterinary medicine (Tolfine ®, Vetoquinol, Lure, France).

In the L10 group, animals identified after clinical examination as late detected were given immediately a single intramuscular dose of 10 mg/kg marbofloxacin (Forcyl ®, Vetoquinol, Lure, France), and a single intramuscular dose of 2 mg/kg tolfenamic acid.

5.4.4.3 2nd line and 3rd line treatments

According to the clinical follow-up, YBs received when needed a 2nd or 3rd line treatment, with florfenicol or tulathromycin, according to the farmers' habits. Treatments were performed according to the regimens labelled in the summary of products characteristics (SPC).

5.4.5 Exposure to antimicrobials and drug consumption

5.4.5.1 Data collection

Prior the study, the volumes of antimicrobials used for systematic treatment were recorded at the market auction place. Thereafter, during the 30 days observation period, all individual 1st, 2nd and 3rd line curative treatments were recorded daily by the veterinarians.

5.4.5.2 Processing of antimicrobial exposure evaluation

The proportion of 1st line and 2nd line treatments was calculated using the formulae in table 1, and expressed in percentage.

The proportion of curative and systematic antimicrobial treatment exposure of YBs was calculated using the formulae in table 1, and expressed as number of treatments /YB at risk. A YB at risk represents a young bull belonging to a group exposed to BRD.

The total exposure of YBs to antimicrobials was evaluated as the sum of the exposure to systematic treatment and the exposure to 1st and 2nd line curative treatment.

Incidence Rate of first (IR1st line) and second (IR2nd line) line treatment for 1000 calves at risk were calculated using the formulae in table 1, and expressed as number of YBs treated one or two times /1000 YBs at risk/day.

5.4.5.3 Processing of antimicrobial consumption evaluation

Antimicrobial consumption was calculated using treatment incidences (TI_{UDD}) based on Used Daily Dose per YB (UDDYB) calculated for each drug using the formula in table 1.

Tableau 5-1 : Formulae for the calculation of the proportion of treatments administered, animal exposure proportion, incidence rates (IR) of treatments and the treatment incidence (TI_{UDD}) based on used daily doses (UDD). YB at risk: young bull belonging to a group exposed to BRD.

Indicator	Formula	Units
Proportion of 1 st line treatment	$100 * \frac{\text{number of YBs treated with a 1st line treatment in the group}}{\text{number of YBs in the group}}$	Percentage
Proportion of 2 nd line treatment	$100 * \frac{\text{number of YBs treated with a 2nd line treatment in the group}}{\text{number of YBs treated with a 1st line treatment in the group}}$	Percentage
Curative exposure proportion	$\frac{\text{number of curative treatments (1st + 2nd + 3rd line)}}{\text{number of YBs at risk}}$	Number of curative treatments / YB at risk
Systematic treatment exposure proportion	$\frac{\text{number of systematic treatments}}{\text{number of YBs at risk}}$	Number of systematic treatments /YB at risk
IR _{1st line}	$1000 * \frac{\text{number of YBs treated with a 1st line treatment}}{\text{number of YBs at risk} * \text{observation period (d)}}$	Number of YBs treated one time /1000 YBs at risk/day
IR _{2nd line}	$1000 * \frac{\text{number of YBs treated with a 2nd line treatment}}{\text{number of YBs at risk} * \text{observation period (d)}}$	Number of YBs treated two times /1000 YBs at risk/day
TI _{UDD x}	$1000 * \frac{\text{amount of antimicrobial x used (mg)}}{\frac{\text{UDDx} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right)}{\text{corrective factor x}} * \text{kg YBs at risk} * \text{observation period (d)}}$	Number of UDD _{YB} /1000 YBs at risk/day

UDD was defined as the administered dose per day per kilogram kg. For marbofloxacin, the retained value of UDD_{marbo}/YB was 2 mg/kg; for tulathromycin, the value of UDD_{tula}/YB was 2.5 mg/kg; for florfenicol, the value of UDD_{flor}/YB was 40 mg/kg; for tildipirosin, the value of UDD_{til}/YB was 4 mg/kg. To encounter the long acting formulation of some drugs, a corrective factor, corresponding to the estimated duration of effects (in days), was attributed for each drug, according to references already used by authorities (European et al., 2015; Postma et al., 2015). The corrective factors were 1, 9.3, 7, and 2 for marbofloxacin, tildopirosin, tulathromycin and florfenicol respectively. So the value of UDD (in mg/kg) was divided by the corrective factor. The amount expressed in mg of active substance was obtained from the volume of antimicrobials recorded. For a pen, the number of kg YBs at risk was calculated as the sum of live body weight of YB at entry in the pen.

5.4.6 Statistical analysis

The proportion of 1st and 2nd line treatments, the proportion of curative and systematic treatment exposure, IR 1st and 2nd line were analysed using a Wilcoxon test. TI_{UDD} marbo and tula-flor were analysed using a chi-square test for independence. Significance was set at $p \leq 0.05$. For the analysis of clinical scores and rectal temperatures, a mixed linear model was tested including variables group of treatment and time as fixed effects and herd and YBs nested in herd as random effects. Statistical analysis were performed with the software SAS (SAS version 9.1 Inst. Inc., Cary, NC).

5.5 Results

5.5.1 Exposure to antimicrobials

In herds A, B, and C, a systematic antimicrobial treatment with tildipirosin was administered at the auction market place before entering the fattening unit. In herd D, E, and F, no systematic treatment was implemented. In herds A, B, and C, YBs requiring a 2nd line treatment were treated with florfenicol; in herds D, E, and F, YBs requiring a 2nd line treatment were treated with tulathromycin. (*cf.* table 2)

Tableau 5-2 : Characteristics of the herds, number of young bulls (YBs) per group and exposure to antimicrobials treatments.

Til: tildipirosin; Flor: florfenicol; Tula: tulathromycin.

Herd	Date of arrival	Mean live weight at arrival (kg \pm SD)	Mean age at arrival (days \pm SD)	Systematic treatment	Antimicrobial used in second line	Group	Number of YBs	Number of curative treatment / YB at risk	Number of systematic treatment / YB at risk	Overall number of treatments / YB at risk
A	2014.12.11	349 +/- 21	250+/- 45	Til	Flor	E2	10	0.5	1	1.5
						L10	20	0.3	1	1.3
B	2014.12.04	293+/- 45	228+/- 33	Til	Flor	E2	21	0.5	1	1.5
						L10	35	0.1	1	1.1
C	2015.01.08	364+/- 18	281+/- 37	Til	Flor	E2	20	0.5	1	1.5
						L10	24	0.1	1	1.1
D	2014.12.11	285+/- 12	238+/- 51	0	Tula	E2	14	0.6	0	0.6
						L10	7	0.4	0	0.4
E	2015.01.15	239+/- 18	220+/- 45	0	Tula	E2	6	1.0	0	1.0
						L10	15	0.7	0	0.7
F	2015.03.05	265+/- 12	237+/- 54	0	Tula	E2	13	0.3	0	0.3
						L10	8	0.0	0	0.0
Total		299+/-21	242+/-44			E2	84	0.5	0.6	1.1
						L10	109	0.2	0.7	0.9

Among the 195 young bulls included in the study, one YB presenting severe signs of lameness 3 days after the start of the study, and one YB with abnormal behavior were excluded. 38 YB were given the early treatment, and 23 were given the late treatment. Figure 1 represents the distribution of the YBs in function of the type of treatment performed and the initial allocation group. Treatments were administered between 2 and 14 days after entering the fattening unit. In E2 groups, the proportion of 1st line treatment and 2nd line treatments were respectively 45 (\pm 9) and 37 (\pm 14) %. In L10 groups, proportion of 1st line treatment and 2nd line treatments were respectively 25 (\pm 25) and 7 (\pm 8) %, as shown in figure 2. Only 3 YBs from the E2 groups received a 3rd curative treatment.

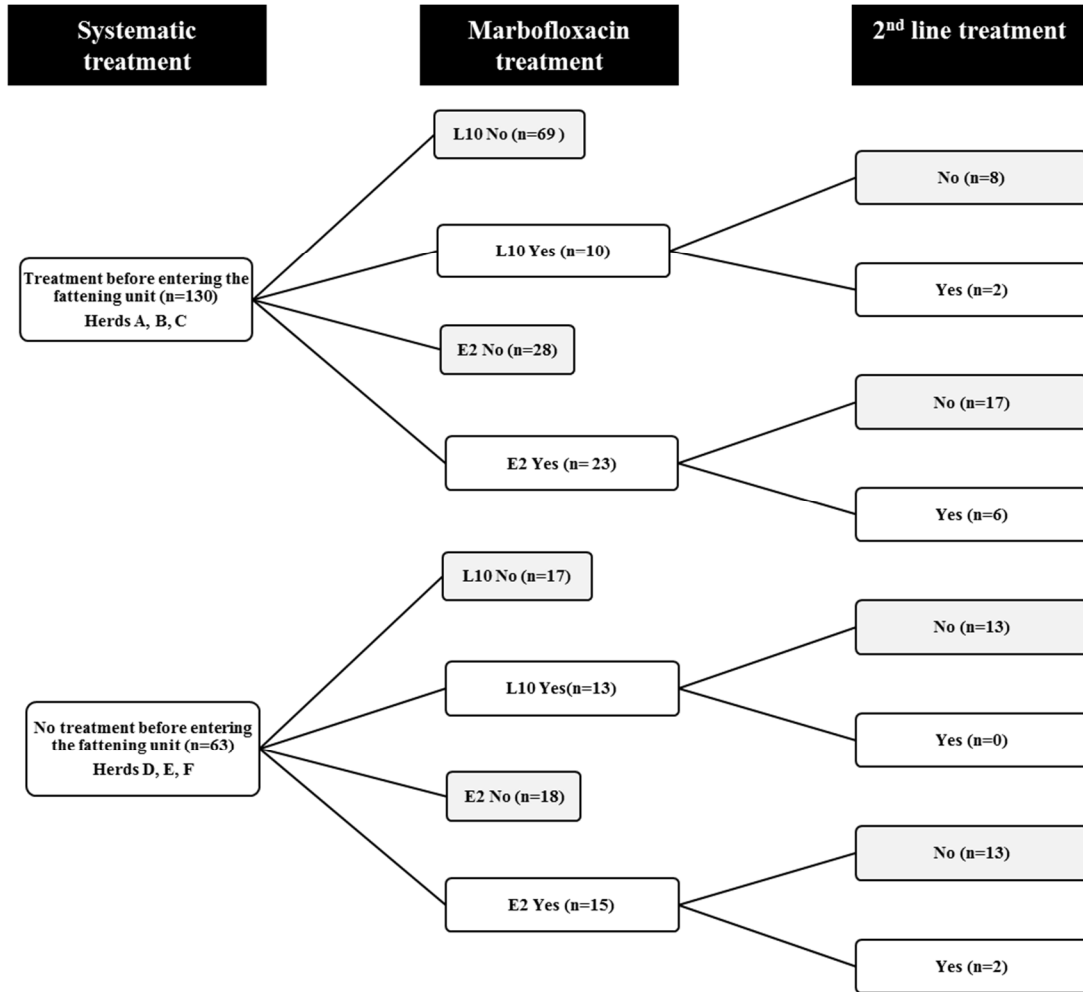


Figure 5-1 : Distribution of the YBs in the groups in function of the treatments administered. In herds A,B,C, systematic antimicrobial treatment was performed with Tildipirosin. In herds A, B, and C 2nd line treatment was florfenicol, in herds D, E, and F, 2nd line treatment was tulathromycin.

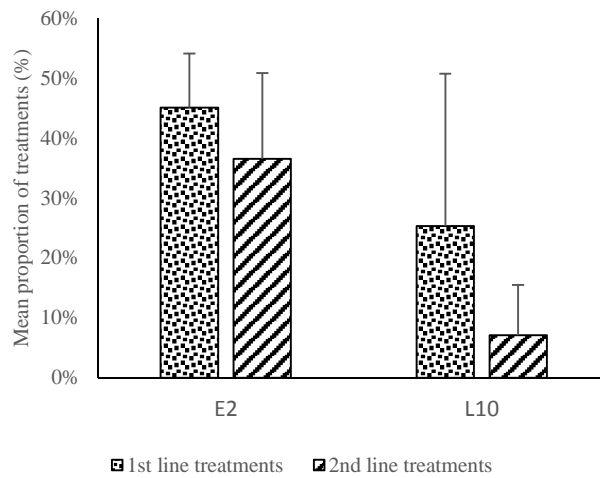


Figure 5-2: Mean proportion of 1st and 2nd line treatments in E2 and L10 groups. The proportion (expressed in percentage) of 1st line treatment is calculated as the number of YBs treated with a 1st line treatment in the group / number of YBs in the group. The proportion of 2nd line treatment is calculated as number of YBs treated with a 2nd line treatment in the group / number of YBs treated with a 1st line treatment in the group.

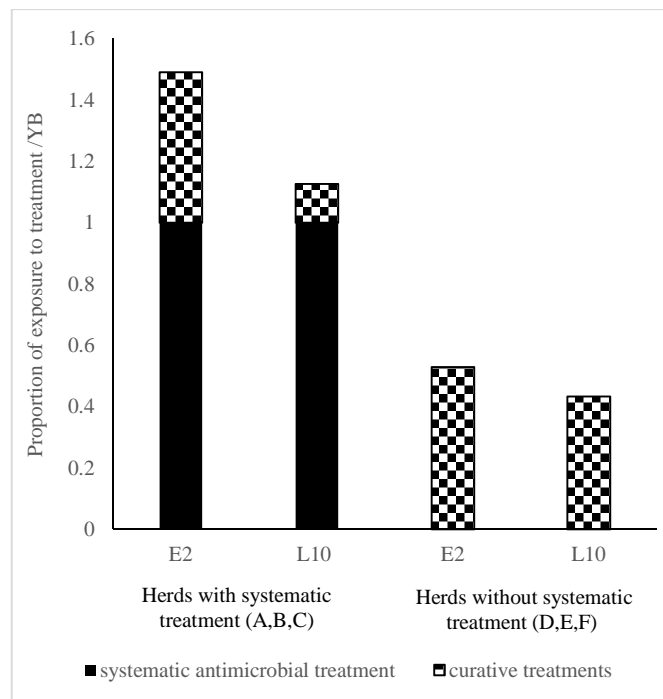


Figure 5-3: Curative and systematic exposures of the young bulls, according to the strategy implemented in the herds (absence or presence of systematic antimicrobial treatment) and the therapeutic strategy (E2 or L10).

During the study period, the mean number of curative treatment per YB at risk was 1.1 in the E2 groups, and 0.9 in the L10 groups. However, we observed a strong variability between herds (*cf.* table 2). Figure 3 shows the exposure to antimicrobials. Overall, herds that did not implement systematic antimicrobial treatment had a higher proportion of exposure to curative treatment (1st + 2nd line) compared to those with. On the contrary, the overall exposure to antimicrobial of YBs remained significantly lower ($p=0.002$) in herds without than in herds with systematic antimicrobial treatment. As presented in table 3, the mean value of IR1st line in the E2 groups was higher (463) than in the L10 groups (255) but did not reach statistical difference ($p=0.13$). In the L10 groups, IR varied strongly between herds, compared to the E2 groups where IR were more homogeneous. The IR2nd line was significantly higher ($p=0.01$) in E2 groups (mean 146 ± 69), compared to L10 groups (mean 24 ± 29).

Tableau 5-3: Incidence rates (IR) of 1st and 2nd line treatments, and amount of curative antimicrobials used expressed in TI_{UDD} according to the herd and the group of treatment. Sum of TI_{UDD} were calculated as the sum of TI_{UDD marbo} and TI_{UDD tula-flor}.

Herd	IR 1st line 1000 YB/d		IR 2nd line 1000 YB/d		TI UDD marbo 1000 YB/dj		TI UDD tula-flor 1000 YB/d		Sum TI UDD 1000 YB/d	
	E2	L10	E2	L10	E2	L10	E2	L10	E2	L10
A	400	250	200	50	19	43	7	2	26	45
B	476	57	190	29	16	8	19	3	35	11
C	450	125	50	0	15	21	3	0	19	21
D	571	429	214	0	20	68	49	0	69	68
E	571	667	143	67	14	116	32	13	46	130
F	308	0	77	0	10	0	37	0	47	0
mean	463	255	146	24	16	43	25	3	40	46
med	463	188	167	14	16	32	26	1	41	33
sd	102	253	69	29	3	44	18	5	18	48

5.5.2 Antimicrobial consumption

Mean TI_{UDD marbo} per 1000 YB/d was higher in L10 group compared to E2 group (43 vs 16), showing significant difference between groups ($p=0.0006$). In the E2 groups, there were less difference between the TI_{UDD marbo} values between herds than in the L10 groups. (*cf.* table 3)

Mean $TI_{UDD\ tula-flor}$ were significantly higher in E2 group compared to L10 group (25 vs. 3), ($p=0.001$).

The mean values of sum $TI_{UDD\ marbo}$ and $TI_{UDD\ tula-flor}$ were 40 and 46 in groups E2 and L10 respectively. Figure 4 depict the impact of systematic antimicrobial treatment on global antimicrobial consumption. TI_{UDD} of systematic treatment represented 90% of TI_{UDD} of the total TI_{UDD} in herds where a systematic antimicrobial treatment was implemented. $TI_{UDD\ marbo}$ and $TI_{UDD\ tula-flor}$ were higher in herds not implementing systematic antimicrobial treatment.

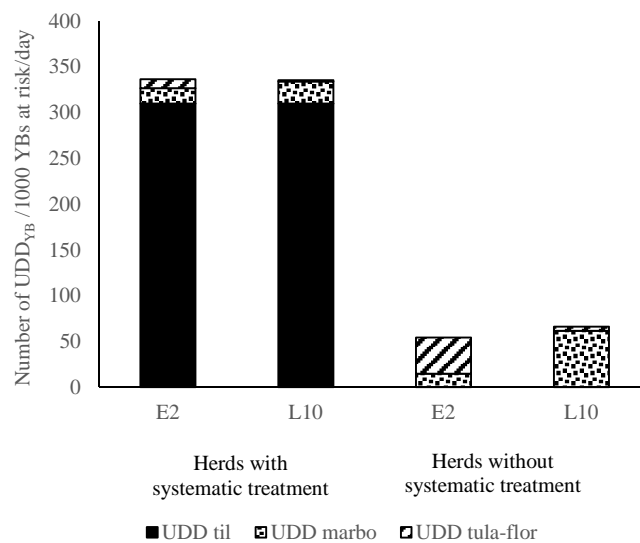


Figure 5-4: Mean antimicrobial usage (tildipirosin for systematic treatment, marbofloxacin as 1st line, tulathromycin or florfenicol as 2nd line), expressed in TI_{UDD} , according to the systematic strategy implemented in the herds (absence or presence), and the therapeutic strategy (E2 or L10).

5.5.3 Clinical scores

Individual response to treatment, assessed by the CS and rectal temperature follow-up, is presented in figure 5. At the time of inclusion, mean CS and rectal temperature values were 5.9 and 40.2°C in E2 group, and 9.9 and 40.6°C in L10 group. In both groups, CS as well as rectal temperature decreased rapidly over time after treatment. 24h after treatment, a significant decrease ($p<0.0001$) in the CS was observed in all groups. Mean CS at D1 was 3 and 2.7 in E2 and L10 groups respectively, corresponding to a physiological CS. In the two groups, mean CS of the calves treated only once remained < 4 from d0 to d10. No significant difference ($p>0.05$) was observed between the groups.

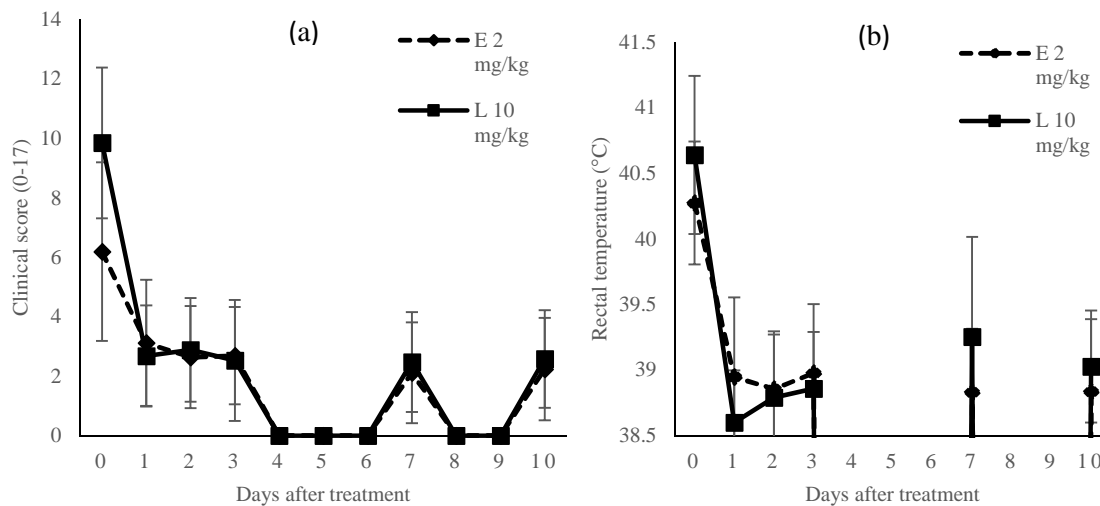


Figure 5-5: Effects of a treatment of 2 or 10 mg/kg of marbofloxacin administered with tolfenamic acid on average total clinical score (a) and rectal temperature (b).

5.5.4 Therapeutic efficacy

In E2 and L10 groups, 65 and 90 % of the YBs were cured with a single injection of 2 or 10 mg/kg of marbofloxacin respectively. Ninety six and 100 % of the YBs treated twice in the E2 and L10 groups were cured at d10. Among the 61 YBs at treatment, only two YBs from the E2 group required more than one second line treatment. One YB of the E2 group from herd A which received three antimicrobial treatments died after the end of the study. Necropsy results reported chronic respiratory lesions affecting the entire lung surface. Overall, 97 and 100 % of the YBs treated in the E2 groups and L10 groups respectively were cured at the end of the study.

5.6 Discussion

Our study aimed to assess the relevance of a protocol decreasing overall antimicrobial consumption in the treatment of BRD. First, we showed that overall consumption of antimicrobials was diminished by using a lower dose of marbofloxacin at early stage of BRD, without affecting the number of animals cured at the end of the study. This decrease was mainly explained by the decrease in marbofloxacin amount, expressed in $TI_{UDD\ marbo}$. The number of 2nd line treatments was higher in groups treated early, which led to an increase in the amount of antimicrobials used in second line compared to L10 groups. However, this increase was widely compensated by the initial decrease of marbofloxacin amount.

The method of evaluation of antimicrobial consumption was based on the last reflection paper on collecting data of consumption developed by the European Medicine Agency (European et al., 2013) and on previous research conducted in livestock production (Pardon et al., 2012; Timmerman et al., 2006). The choice of using indicators shared by regulatory agencies and other research units will allow to compare drug consumption between our study and future studies referring to the same methodology. For each drug, Used Daily Dose was assigned with the principles used by the European Medicine Agency EMA to determine the Defined Daily Dose for Animals (DDDA). Several indicators were retained in our study for the complementarity of the information provided. Hence, TI_{UDD} and IR were calculated in a similar way, to draw a parallel between the incidence ratio of treatment and the amount of antimicrobials used per YB exposed. Curative and systematic treatment exposure provided information on the number of treatments received per YB exposed.

Our study was conducted in a large variety of field situations including fattening units where systematic antimicrobial treatment was implemented and others where it was not. We observed that regardless of the initial systematic strategy implemented, curative antimicrobial consumption was decreased in E2 groups. Despite a slightly lower number of 1st and 2nd line treatments, the amount of antimicrobial used for systematic treatment represented more than 90% of the total amount of antimicrobials, in herds with systematic antimicrobial treatment. This observation suggests that rationalisation of systematic antimicrobial treatment might significantly reduce global antimicrobial consumption. Evaluation of exposure of YBs to antimicrobials was performed by adding up the number of systematic and curative treatments. Exposure was higher in the E2 groups compared to the L10 groups. This can be explained by the increased proportions of 1st and 2nd line treatment. In herds implementing systematic treatment, the proportions of 1st and 2nd line treatment were decreased, but without significant differences, compared with the herds not implementing systematic treatment. These results suggest that systematic antimicrobial treatment decreased the proportion of clinical BRD, but might not prevent their apparition.

To our knowledge, it is the first time that treatment incidences of used daily doses has been calculated in a field study with YBs; therefore it was difficult to compare the amount of antimicrobials used with other studies.

Several experiments investigating the efficacy of antimicrobial treatments of BRD in YBs reported data on the incidence of clinical cases and relapses. In our study, the proportion YB requiring a 1st line treatments was 38/84 (45%) and 23/109 (21%) in E2 and L10 groups, respectively. The proportion of treatments in L10 group, corresponding to a clinical detection of disease in standard

field conditions was comparable to those observed in previous studies. One study investigating exposure to pathogens and incidence of respiratory disorders reported an incidence rate of 18.5% in similar husbandry conditions (Assie et al., 2009). In Northern America, the US department of agriculture reported 14.4% of cattle placed in feedlots developed BRD in feedlot study from 1999 (Agriculture, 2013).

We observed that a treatment with 10 mg/kg of marbofloxacin, corresponding to the regimen recommended in the SPC, cured 90% of the animals affected with clinical BRD. These results are supported by those obtained in a field study reporting a success rate of 85% with a single injection of 10 mg/kg marbofloxacin for treatment of BRD (Grandemange, 2012). The therapy implemented in the L10 groups, *ie* an antimicrobial treatment based upon the detection of clinical signs of BRD, corresponded to a traditional field situation. The success rate of a dose of 2 mg/kg of marbofloxacin given after early detection was 65%, leading to a higher number of 2nd line treatment, without affecting the overall global success rate of the protocol. Efficacy of the two alternative protocols, assessed in terms of number of young bulls cured at the end of the study was similar in the two groups.

Various hypotheses can be advanced to explain the higher number of first and second line treatments observed in the E2 groups. In the E2 groups, YBs were considered as early detected in our study upon the basis of a first persistent increase in their ruminal temperature above 40.2°C for more than 12h, and confirmed by a rectal temperature >39.7°C at the time of clinical examination. These thresholds were based on previous field study in young bulls. Timsit et al. (Timsit et al., 2011b) showed that young bulls with a ruminal hyperthermia for more than 6 h and a rectal temperature >39.7°C, demonstrated it's first clinical signs of BRD 19 h after the onset of hyperthermia. The positive predictive value of this method of detection of BRD was 85%. The reticulo-ruminal temperature of 40.2°C was fixed as a threshold alert value since reticulo-ruminal temperature was found to be well correlated with rectal temperature, with a mean difference of 0.5°C with rectal temperature reference. The rectal temperature value of 39.7°C is commonly retained as the threshold value for diagnosis of abnormal temperature in young bulls (Galyean et al., 1995; Schaefer et al., 2007; Timsit et al., 2011a). To ensure that YBs detected early presented slight respiratory disorders or an increased rectal temperature, a physical examination was performed. Therefore, the follow-up of ruminal temperature and clinical examination before inclusion minimized the risk of including YBs not presenting BRD. This was confirmed by the clinical scores and rectal temperature values at the time of inclusion, which were lower in E2 compared to L10 groups. However, it has been shown that clinical signs of BRD were not

systematically observed on YB presenting ruminal hyperthermia (Timsit et al., 2011b). Two field studies assessing early detection of BRD reported predictive positive values of 80 and 75% of ruminal hyperthermia for detection of BRD. Hence, it is possible that we included YB in E2 groups that would not have presented clinical signs, explaining the higher proportion of 1st line treatments in the E2 groups (Schaefer et al., 2007). However, even if we might have included YBs which did not require treatments in E2 groups, global antimicrobial consumption remained lower than in L10 groups.

The adjusted marbofloxacin dosage was based upon pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial efficacy previously published (Potter et al., 2013; Valle et al., 2012). This dosage was also successfully tested for the treatment of an experimental lung infection with *Mannheimia haemolytica* in calves (Guillaume Lhermie, Aude Ferran, Sébastien Assié, Hervé Cassard, Farid El Garch, Marc Schneider, Frédérique Woerhlé, Diane Pacalin, Maxence Delverdier, Alain Bousquet-Melou, Gilles Meyer, unpublished results). In this study, calves were treated with 2 mg/kg of marbofloxacin 6 to 10 h after inoculation of the pathogen in one group, or treated with 10 mg/kg at 36 to 40 h after inoculation in a second group. Efficacy of this decreased regimen administered early was found to be as good as a higher regimen at a later stage of illness, and was associated to the size of the inoculum at the time of treatment. Similar results were observed in various in vitro and in vivo studies conducted with fluoroquinolones, stressing the existence of inoculum effect (Ferran et al., 2009; Kesteman et al., 2009; Mizunaga et al., 2005; Udekwu et al., 2009). In our study, the adjusted dosage was the lowest dose ensuring bactericidal efficacy, assuming that early detection allowed operating on a low bacterial inoculum. We hypothesized that severity of clinical signs was correlated to the inoculum size to implement after early detection of the disease a protocol using a decreased antimicrobial regimen. Only few experimental models of *M. haemolytica* and *Pasteurella multocida* BRD investigated this issue. Overall, the severity of clinical signs and pulmonary lesions seemed to decrease as the initial size of infectious inoculum decreased (Ames et al., 1985; Dowling et al., 2002; Panciera and Corstvet, 1984), stressing the interest of an early intervention for therapeutic efficacy, clinical recovery and animal welfare. This adjusted treatment should also have the lowest impact possible on the commensal flora of treated animals.

Influence of bacterial inoculum size on bactericidal activity of marbofloxacin has been demonstrated in several in vitro and in vivo studies, supporting the decrease dosage in the tested regimen. However in all these studies, the pathogen species and inoculum size at the time of treatment were known, which was not the case in our field study. As hyperthermia and clinical

signs monitored are not pathognomonic of bacterial pneumonia, it is possible that some YBs included presented a viral infection. However, bacteria from Pasteurellaceae family (*M. haemolytica*, *P. multocida* and *Histophilus somni*) are most frequently identified as pathogen agent of BRD in YBs in France (Assie et al., 2009), North America (Confer, 2009; Fulton et al., 2009; Rice et al., 2007), and Australia (Cusack et al., 2003). It is also possible that our inclusion criteria partially failed to detect accurately early stage of BRD. In our field conditions study, it was impossible to determine the presence of the pathogen at the infectious site. Therefore, the decreased dose of antimicrobial could have been administered too early or too late with regards to pathogen identification and inoculum size. This could also explain the higher proportion of 2nd line treatments required in the E2 group.

At the individual level, clinical signs severity decreased within 24h after antimicrobial injection, suggesting the start of the recovery, regardless of the treatment received. The combination of the antimicrobial with NSAIDs may have played a role to fasten recovery; however, these results agree with previous field studies, investigating the effects of a single marbofloxacin injection on rectal temperature and clinical status of animals naturally infected with various respiratory pathogens. A decrease in rectal temperature was also seen in 24h (Thomas et al., 2001). In addition, it was shown in ruminants, that a simultaneous injection of tolfenamic acid didn't affect marbofloxacin pharmacokinetic profile (Sidhu et al., 2011).

In conclusion, we demonstrated that the combination of early detection of disease treated with lower antimicrobial doses could be used to decrease antimicrobial consumption at the herd level without affecting treatment efficacy. These findings highlight the interest of rationalisation of antimicrobial use in field conditions, to limit the overall consumption of antimicrobials and their shedding in the environment. With regards to global antimicrobial consumption in food producing animals and its impact on selection of resistant bacteria, it would be relevant to demonstrate the reproducibility of our results in various epidemiological contexts, or in others food animal production chains. Assessing the impact of various antimicrobial regimen on commensal gut flora would also be of high value with regards to the concept of One Health.

5.7 References

Agerso, Y., Aarestrup, F.M., 2013, Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *J Antimicrob Chemother* 68, 569-572.

- Agriculture, U.S.D.o. 2013. Types and costs of respiratory disease treatments in the U.S. feedlots, (Ed.), I.U.A.V., National Animal Health Monitoring System, F., CO., C., eds., p. 2.
- Ames, T.R., Markham, R.J., Opuda-Asibo, J., Leininger, J.R., Maheswaran, S.K., 1985, Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Can J Comp Med* 49, 395-400.
- Apley, M., 1997, Antimicrobial therapy of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13, 549-574.
- Assie, S., Seegers, H., Makoschey, B., Desire-Bousquie, L., Bareille, N., 2009, Exposure to pathogens and incidence of respiratory disease in young bulls on their arrival at fattening operations in France. *Vet Rec* 165, 195-199.
- Bywater, R.J., 2004, Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 361-363.
- Confer, A.W., 2009, Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev* 10, 145-148.
- Cusack, P.M., McMeniman, N., Lean, I.J., 2003, The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J* 81, 480-487.
- Dowling, A., Hodgson, J.C., Schock, A., Donachie, W., Eckersall, P.D., McKendrick, I.J., 2002, Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3. *Res Vet Sci* 73, 37-44.
- European, Medicine, Agency 2013. Revised ESVAC reflection paper on collecting data on consumption of antimicrobial agents per animal species, on technical units of measurement and indicators for reporting consumption of antimicrobial agents in animals.
- European, Medicine, Agency 2015. Principles on assignment of defined daily dose for animals (DDDA) and defined course dose for animals (DCDA). p. 64.
- Ferran, A.A., Kesteman, A.S., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009, Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3384-3390.
- Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2011, Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection. *Vet Microbiol* 148, 292-297.
- Fulton, R.W., 2009, Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Anim Health Res Rev* 10, 131-139.

- Fulton, R.W., Blood, K.S., Panciera, R.J., Payton, M.E., Ridpath, J.F., Confer, A.W., Saliki, J.T., Burge, L.T., Welsh, R.D., Johnson, B.J., Reck, A., 2009, Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *J Vet Diagn Invest* 21, 464-477.
- Galyean, M.L., Gunter, S.A., Malcolm-Callis, K.J., 1995, Effects of arrival medication with tilmicosin phosphate on health and performance of newly received beef cattle. *J Anim Sci* 73, 1219-1226.
- Grandemange, E., Fournel, S., Giboin, H., Woerhlé, F., 2012, Efficacy of a single injection of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *Revue Médecine Vétérinaire* 6, 287-294.
- Heins, B.D., Nydam, D.V., Woolums, A.R., Berghaus, R.D., Overton, M.W., 2014, Comparative efficacy of enrofloxacin and tulathromycin for treatment of preweaning respiratory disease in dairy heifers. *J Dairy Sci* 97, 372-382.
- Heuer, O.E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., Angulo, F.J., 2009, Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis* 49, 1248-1253.
- Hoar, B.R., Jelinski, M.D., Ribble, C.S., Janzen, E.D., Johnson, J.C., 1998, A comparison of the clinical field efficacy and safety of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease of cattle in western Canada. *Can Vet J* 39, 161-166.
- Kesteman, A.S., Ferran, A.A., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Sanders, P., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009, Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4740-4748.
- Laxminarayan, R., 2014, Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. *Science* 345, 1299-1301.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O., 2013, Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13, 1057-1098.
- Madec, J.Y., Poirel, L., Saras, E., Gourguechon, A., Girlich, D., Nordmann, P., Haenni, M., 2012, Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like bla(CTX-M-15)-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother* 67, 578-581.

- McEwen, S.A., Fedorka-Cray, P.J., 2002, Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis* 34 Suppl 3, S93-S106.
- Mizunaga, S., Kamiyama, T., Fukuda, Y., Takahata, M., Mitsuyama, J., 2005, Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 56, 91-96.
- Nickell, J.S., White, B.J., 2010, Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26, 285-301.
- O'Connor, A.M., Coetzee, J.F., da Silva, N., Wang, C., 2013, A mixed treatment comparison meta-analysis of antibiotic treatments for bovine respiratory disease. *Prev Vet Med* 110, 77-87.
- Pancieria, R.J., Corstvet, R.E., 1984, Bovine pneumonic pasteurellosis: model for *Pasteurella haemolytica*- and *Pasteurella multocida*-induced pneumonia in cattle. *Am J Vet Res* 45, 2532-2537.
- Pardon, B., Catry, B., Dewulf, J., Persoons, D., Hostens, M., De Bleecker, K., Deprez, P., 2012, Prospective study on quantitative and qualitative antimicrobial and anti-inflammatory drug use in white veal calves. *J Antimicrob Chemother* 67, 1027-1038.
- Postma, M., Sjolund, M., Collineau, L., Losken, S., Stark, K.D., Dewulf, J., 2015, Assigning defined daily doses animal: a European multi-country experience for antimicrobial products authorized for usage in pigs. *J Antimicrob Chemother* 70, 294-302.
- Potter, T., Illambas, J., Pelligand, L., Rycroft, A., Lees, P., 2013, Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and modelling of marbofloxacin in calves for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Vet J* 195, 53-58.
- Rice, J.A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D.C., Shewen, P.E., 2007, *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8, 117-128.
- Schaefer, A.L., Cook, N.J., Church, J.S., Basarab, J., Perry, B., Miller, C., Tong, A.K., 2007, The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Res Vet Sci* 83, 376-384.
- Sidhu, P.K., Landoni, M.F., Aliabadi, M.H., Toutain, P.L., Lees, P., 2011, Pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling of marbofloxacin administered alone and in combination with tolfenamic acid in calves. *J Vet Pharmacol Ther* 34, 376-387.
- Singer, R.S., Finch, R., Wegener, H.C., Bywater, R., Walters, J., Lipsitch, M., 2003, Antibiotic resistance--the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis* 3, 47-51.

- Thomas, E., Caldow, G.L., Borell, D., Davot, J.L., 2001, A field comparison of the efficacy and tolerance of marbofloxacin in the treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther* 24, 353-358.
- Timmerman, T., Dewulf, J., Catry, B., Feyen, B., Opsomer, G., de Kruif, A., Maes, D., 2006, Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Prev Vet Med* 74, 251-263.
- Timsit, E., Assie, S., Quiniou, R., Seegers, H., Bareille, N., 2011a, Early detection of bovine respiratory disease in young bulls using reticulo-rumen temperature boluses. *Vet J* 190, 136-142.
- Timsit, E., Bareille, N., Seegers, H., Lehebel, A., Assie, S., 2011b, Visually undetected fever episodes in newly received beef bulls at a fattening operation: occurrence, duration, and impact on performance. *J Anim Sci* 89, 4272-4280.
- Torres, S., Thomson, D.U., Bello, N.M., Nosky, B.J., Reinhardt, C.D., 2013, Field study of the comparative efficacy of gamithromycin and tulathromycin for the treatment of undifferentiated bovine respiratory disease complex in beef feedlot calves. *Am J Vet Res* 74, 847-853.
- Udekwa, K.I., Parrish, N., Ankomah, P., Baquero, F., Levin, B.R., 2009, Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 63, 745-757.
- Valle, M., Schneider, M., Galland, D., Giboin, H., Woehrlé, F., 2012, Pharmacokinetic and pharmacodynamic testing of marbofloxacin administered as a single injection for the treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther* 35, 519-528.
- van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A., Kluytmans, J., 2007, Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 13, 1834-1839.
- Vieira, A.R., Collignon, P., Aarestrup, F.M., McEwen, S.A., Hendriksen, R.S., Hald, T., Wegener, H.C., 2011, Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. *Foodborne Pathog Dis* 8, 1295-1301.
- Wang, H., McEntire, J.C., Zhang, L., Li, X., Doyle, M., 2012, The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Rev Sci Tech* 31, 249-260.

6. CHAPITRE 6. EVALUATION DE L'IMPACT DE DEUX
DOSES DE FLUOROQUINOLONE SUR LA SELECTION DE
BACTERIES RESISTANTES DANS LA FLORE INTESTINALE
COMMENSALE DU VEAU ET DU JEUNE BOVIN

**Etude expérimentale n°4: Impact of low and high
antimicrobial doses on the selection of resistant
Enterobacteriaceae in the commensal gut flora of veal
calves and young bulls treated with a fluoroquinolone**

from G. Lhermie, F. El Garch, V. Dupouy, A. Bousquet-
Melou, H. Seegers and S. Assié

Soumission prévue au journal ZOOZOSES AND PUBLIC HEALTH le 15 septembre
2015

6.1 Résumé en français

Dans un contexte de promotion de l'usage prudent et parcimonieux des antibiotiques en médecine vétérinaire, notre objectif était d'évaluer l'impact de deux posologies d'une fluoroquinolone sur la flore commensale digestive de deux cohortes de jeunes bovins (JB) et de veaux traités pour bronchopneumonie infectieuse (BPI) au cours de deux études différentes. Quarante-huit JB et 32 veaux ont été répartis de manière aléatoire dans un des deux groupes de traitement, LOW et HIGH, ou dans un groupe contrôle non traité. Dans les groupes LOW, les animaux ont reçu une injection intramusculaire unique de 2 mg/kg de marbofloxacin, une fluoroquinolone à action brève couramment utilisé dans le traitement des BPI. Dans les groupes HIGH, les animaux ont reçu une injection intramusculaire unique de 10 mg/kg de marbofloxacin. Les fèces ont été prélevées avant le traitement (administré à J0), et à plusieurs reprises jusqu'à 5 à 40 jours après le traitement, en fonction de l'étude. Le nombre d'entérobactéries totales et résistantes a été évalué après mise en culture de différentes dilutions des échantillons fécaux sur gélose Mac Conkey supplémentée ou non en marbofloxacin (JB) ou ciprofloxacin (veaux) aux concentrations critiques définies par le CA-SFM.

Dans la cohorte des JB, seul deux animaux sur 48 étaient porteurs d'entérobactéries résistantes avant traitement. Chez les JB, l'administration de marbofloxacin aux deux doses a été associée avec une diminution modérée et transitoire du nombre total d'entérobactéries entre J1 et J3 après traitement, avec dans tous les cas un retour au niveau initial à J7. Un seul JB du groupe HIGH a présenté des entérobactéries résistantes à la marbofloxacin après traitement.

Dans la cohorte des veaux, tous les animaux étaient porteurs d'entérobactéries résistantes avant traitement, avec des proportions moyennes par groupe supérieures à 60% des entérobactéries totales. Après traitement à la marbofloxacin, le nombre d'entérobactéries totales n'a pas été modifié par rapport aux animaux contrôle, alors que le nombre d'entérobactéries résistantes a montré une tendance à la hausse. Il en a résulté une augmentation de la proportion des entérobactéries résistantes dans les deux groupes traités (LOW et HIGH) par rapport au groupe contrôle.

Nos résultats ont tout d'abord mis en évidence une différence spectaculaire du portage d'entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones entre la cohorte de veaux et celle des JB. Pour ce qui concerne l'impact des traitements antibiotiques, l'ensemble des résultats indique que malgré son amplitude (d'un facteur 5), la différence de posologies de marbofloxacin n'a pas produit au sein d'une même cohorte d'effets sensiblement différents en termes de sélection/amplification des

entérobactéries résistantes. Il est à signaler que les deux traitements utilisés consistent en des administrations uniques, qui s'accompagnent probablement d'une pression de sélection sur la flore digestive de courte durée. Selon les cohortes étudiés, l'absence de modifications importantes ou durables des entérobactéries résistantes chez les animaux traités peut être expliquée, soit parce que les animaux n'étaient pas porteurs de souches résistantes pouvant être sélectionnées (cohorte des JB), soit parce que les souches résistantes étaient déjà présentes en proportions majoritaires dans leurs flores digestives (cohorte des veaux). Au final, il apparaît crucial dans un contexte de préservation de la santé publique de comprendre et d'analyser les facteurs expliquant les niveaux de portage d'entérobactéries résistantes chez le veau.

6.2 Abstract

In the context of requested decrease of antimicrobial use in human and veterinary medicine, our objective was to assess in two experiments the impact on commensal gut flora of a fivefold decreased antimicrobial regimen administered to a cohort of young bulls (YBs) and a cohort of veal calves (VCs) to treat bovine respiratory disease (BRD). Forty eight YBs and 32 VCs were randomly assigned to one of the two experiment groups **LOW** and **HIGH** based on treatment regimen. In **LOW** group, animals were given a single intramuscular injection of 2 mg/kg marbofloxacin, a short acting fluoroquinolone commonly used in the treatment of BRD. In **HIGH** group, animals were given a single intramuscular injection of 10 mg/kg marbofloxacin. Faeces were sampled on day 0 just before treatment, and at several times after treatment until 5 or 40 days, depending on the experiment. Total and resistant *Enterobacteriaceae* counting was performed by plating dilutions of faecal samples on Mac Conkey agar plates supplemented or not with quinolone.

Only a few YBs harbored resistant *Enterobacteriaceae* before and after treatment, whereas ciprofloxacin resistant *Enterobacteriaceae* were isolated in all VCs before treatment. Marbofloxacin treatment was associated with a slight transient decrease in total *Enterobacteriaceae* count between D1 and D3 after treatment, in the two cohorts studied. Total *Enterobacteriaceae* count returned to baseline at D7 in all groups. For VCs, and a higher proportion of quinolone resistant *Enterobacteriaceae* was observed one day after treatment whatever the regimen. These higher proportions were mainly associated to a decrease in the number of susceptible *Enterobacteriaceae* in treated calves. Marbofloxacin treatment exerted a low selective pressure on resistant *Enterobacteriaceae*. In YBs, 2 out of 14 YBs harbored *Eenterobacteraiceae* with decreased susceptibility to marbofloxacin. Only one YB from the HIGH group harbored marbofloxacin resistant *Enterobacteriaceae*. Our results suggest that a unique treatment with 2 or 10 mg/kg marbofloxacin exerts a low selective pressure on commensal *Enterobacteriaceae* in YBs and in VCs. A decrease in antibiotic regimen allowed to limit the decrease of total *Enterobacteriaceae* count. Such findings enlighten that protocols using short acting fluoroquinolones may limit selection of resistant bacteria among commensal flora possibly transferred to humans.

Key words: fluoroquinolone, cattle, antimicrobial resistance, *Enterobacteriaceae*, decreased dose

6.3 Introduction

Antimicrobial resistance is a major global public health concern in human and veterinary medicine (Laxminarayan et al., 2013). The use of antimicrobials in both human and veterinary medicine leads to the selection of resistant pathogenic and commensal bacteria, under various conditions of usage of antibiotics (Agero and Aarestrup, 2013; Bywater, 2004; McEwen and Fedorka-Cray, 2002; van Loo et al., 2007). Direct or indirect transfer *via* the food chain or the environment of resistant bacteria or resistance genes between animals exposed to antibiotics and humans represents a potential hazard for human health (Heuer et al., 2009; Madec et al., 2012; Singer et al., 2003; Trieu-Cuot et al., 1993; van Loo et al., 2007; Vieira et al., 2011; Wang et al., 2012). In this context, crucial issues are to decrease the number of animals unnecessarily treated, to use “as little as possible, as much as necessary” antimicrobials when they are needed, to maintain their effectiveness (Laxminarayan, 2014).

In Ruminant medicine, treatments include a wide variety of molecules, among them the most frequent used are penicillins, tetracyclines, macrolides, and quinolones (De Briyne et al., 2013). The most frequent uses of marbofloxacin, a third generation fluoroquinolone, are dedicated to the treatment of bovine respiratory, digestive and udder infections. Recent studies led to an evolution in the administered marbofloxacin regimens, fulfilling the double objective of decreasing selection pressure on both pathogen and commensal bacteria (Valle et al., 2012). Hence, recommended dose has been increased from 2 to 10 mg/kg, given in a single injection instead of three consecutive injections. On the other hand, several studies stressed the interest of decreasing the dose administered to achieve similar bacterial cure, when low bacterial inocula are targeted and the disease is detected early (Ferran et al., 2011; Kesteman et al., 2009). It is clear that such protocols allow a large reduction in the antibiotic amount needed for treatments.

Yet, the relation between antibiotic dosage and emergence of bacterial resistance in commensal flora, assessed in several studies in human and veterinary medicine, remains unclear. On one hand, it was found that bacterial resistance emerged in pharyngeal and intestinal flora from healthy volunteers treated with ciprofloxacin whatever the regimen (Fantin et al., 2009). In pigs treated with enrofloxacin, escalating doses of antibiotic did not prevent selection of resistant coliforms in gut (Wiuff et al., 2003). On the other hand, it has been shown that in a pig model, lower ciprofloxacin doses limited resistance amplification in gut microbiota (Nguyen et al., 2012). Such results were also observed by Vasseur et al. with cefquinome, in a rodent model of *Klebsiella pneumoniae* infection (Vasseur et al., 2014). Therefore, the impact of a decreased antimicrobial

regimen regarding antimicrobial resistance “development on gut flora in cattle medicine remains to be explored. Regarding the prevalence of resistant bacteria, several studies reported that the level of resistance varied between animals cohorts. As a matter of fact, non-weaned calves are related to frequently carry resistant bacteria in their digestive tract, when the prevalence of resistant bacteria seems to be lower in weaned animals and adults. As an example, the annual monitoring of resistance to antimicrobials in veterinary medicine conducted in France by the National Food Safety Agency (Anses) highlights that for 3rd generation cephalosporins, resistance level is fivefold increased between young and adult cattle (Anses, 2014). Housing and dietary changes such as weaning are factors influencing the composition of gut microbiota and the level of resistance in commensal *E. coli* (Berge et al., 2005; Hoyle et al., 2004; Khachatryan et al., 2004). The fact that young animals are more frequently exposed to antimicrobials for medication or growth promotion and that current practice of feeding includes waste milk containing antimicrobials residues could also explain a higher prevalence of resistance in preweaned calves (Berge et al., 2006; Hoyle et al., 2004; Langford et al., 2003; Pereira et al., 2014). For fluoroquinolones, some studies estimated that the resistance level of *E. coli* between 10 and 25% in veal calves, when resistance in older cattle is not well documented (Anses, 2014; EFSA, 2010; Hordijk et al., 2012).

The aim of our study was to assess the impact of several dosages of marbofloxacin, administered on young bulls and veal calves on the total count of *Enterobacteriaceae* in gut flora and on the emergence of clinically resistant *Enterobacteriaceae*.

6.4 Material and methods

6.4.1 Experiment on young bulls (YB)

6.4.1.1 Animals and antimicrobial treatments

Forty-eight ruminant young bulls (YBs) aged between 7 and 10 months with an average body weight of 299 kg were recruited at their entry in 6 commercial fattening units (farms A to E). History of previous antibiotic treatments before the period of experiment was not known. When entering the fattening unit (five to ten days before the start of the experiment) (d-5 to d-10), YBs from farms A, B, C received a single antibacterial intramuscular injection of 2.5 mg/kg tildipirosin (Zuprevo MSD, France), while YBs from farms C, D, E did not receive any antimicrobial treatment. In each fattening unit, YBs randomly selected for the study were issued from barns of 8 to 10 animals, and allocated to one of the two treatment groups. At day 0, YBs from the group

LOW (n=14) were administered a single intramuscular injection of 2mg/kg marbofloxacin (Marbocyl®, Vétoquinol, France), and YBs from the group **HIGH** (n=14) were administered a single intramuscular injection of 10 mg/kg marbofloxacin (Forcyl®, Vétoquinol, France). To constitute a control group, we also included untreated YBs belonging to the same barn of origin of the treated YBs. The control group was finally constituted with untreated YBs congeners to YBs from HIGH group (n=10) and from LOW group (n=10) (see table 1).

Tableau 6-1: Descriptive table of the number of YBs sampled from day [-10;-3] to day 40 during the first experimentation according to their treatment.

	Treatment group	D [-10;-3]	D0	D3	D7	D10	D21	D40
Treated YBs	LOW	14	14	14	14	14	13	14
	HIGH	13	14	14	13	13	12	14
Untreated congeners YBs	LOW	10	4	8	10	8	10	10
	HIGH	10	6	9	9	10	10	10

6.4.1.2 Faecal sampling and bacteriology

Faeces were collected from each YB, by digital manipulation or immediately after spontaneous defecation, before treatment at days [-10 ; -3] and 0, and after treatment at days 1, 3, 7, 10, 20 and 40. Two g of faeces from each animal and 18 ml of peptone water, with 30% glycerol, were placed in a BagFilter filter bag (Interscience, St. Nom, France). In the filter bag, the sample was blended, homogenized, and filtered using a BagMixer paddle blender (Interscience, St. Nom, France). 3 aliquots of 2 ml each were then stored at -80°C, before analysis. For analysis, tenfold serial dilutions of the filtrate were prepared, and 100-µL samples of the dilutions were spread on MacConkey agar using a spiral plater (Interscience, St. Nom, France). In order to select strains with decreased susceptibility or resistant to marbofloxacin, fecal samples were also plated on MacConkey agar containing 0.12 and 4 µg/mL of marbofloxacin respectively. Colonies were counted after 24 hours incubation at 37°C. The lowest level of detection was 200 CFU/g faeces.

6.4.2 Experiment on veal calves (VC)

6.4.2.1 Animals and antimicrobial treatments

Thirty-two dairy calves were selected at birth and reared until to 2-3 weeks of age (weight range from 47 to 75 kg) in French experimental units (INRA, Domaine de Borculo, Exmes, France).

Calves were colostrum deprived after birth and fed with milk powder and colostrum substitute (CER Marloie, Belgium) from day 2 to day 7 of age, as previously described (Riffault et al., 2010). Calves were given a daily intramuscular dose of 1 mg/kg cefquinome (Cobactan, MSD, France) from birth to 7 days. At three weeks of age, calves were then transported and allocated to specific experimental units in collective pens of 3 to 4 animals with free access to hay and fresh water (experimental units of Toulouse, France). They were fed ad libitum with starter food (Passio Floc Junior, SudOuestAliments, Anan, France) and once a day with a milk replacer (Laitine Tech®, Bonilait-protéines, Chasseuneuil du Poitou, France). They remained fully healthy during the 10 days-period before experiment. On day 0, calves from the group **LOW** were administered a single intramuscular injection of 2mg/kg marbofloxacin (Marbocyl®, Véroquinol, France), and calves from the group **HIGH** were administered a single intramuscular injection of 10 mg/kg marbofloxacin (Forcyl®, Véroquinol, France). A non-treated group of 5 calves served as control (see **table 2**).

Tableau 6-2: Descriptive table of the number of calves sampled from day -4 to day 5 during the second experimentation according to their treatment.

Treatment group	D-4	D-3	D-1	D0	D1	D2	D4	D5
Control	0	5	4	5	5	5	0	3
LOW	8	6	9	14	13	7	9	6
HIGH	9	3	9	12	12	3	9	3

6.4.2.2 Faecal sampling and bacteriology

In the LOW group, feces were sampled on each calf before treatment at days -3, 0, and after treatment at days 1, 2 and 5. In the HIGH group, feces were sampled before treatment at days -4, 0, and after treatment at days 1 and 4. Fecal samples were then treated as described above before experiment. For bacteriology, the count of total and resistant *Enterobacteriaceae* was determined by plating dilutions of faecal samples on Mac Conkey agar plates without antibiotics, supplemented with 32 µg/mL of nalidixic acid, or supplemented with 2 µg/mL of ciprofloxacin. The lowest level of detection was 200 CFU/g faeces.

6.4.3 Statistical analysis

Average counts of total and resistant *Enterobacteriaceae* were firstly analysed using a repeated measure ANOVA, considering the effect of time and group. When a significant interaction between time and group was observed, a Kruskal-Wallis test was used to compare treatment groups

on each sample day. Statistical analysis were performed with the software SAS (SAS version 9.1 Inst. Inc., Cary, NC).

6.5 RESULTS

6.5.1 Experiment YB

6.5.1.1 Bacterial counts

Average counts of total and resistant *Enterobacteriaceae* are given in figure 1. Before treatment, total *Enterobacteriaceae* counts were similar in the three groups. At D3, a transient decrease in total *Enterobacteriaceae* count was observed in the HIGH and LOW groups. This decrease was higher in group HIGH ($-2 \log_{10}$) than in group LOW ($-1 \log_{10}$). Significant differences were observed at D3 between the control groups and the two treated groups, and between group LOW and group HIGH ($p < 0.0001$). Total *Enterobacteriaceae* count returned to baseline at D7 in both groups. Average counts of *Enterobacteriaceae* with decreased susceptibility or resistant to marbofloxacin remained under or close to our limit of detection from D0 to day 40 in each groups.

6.5.1.2 Numbers of animals harboring resistant strains before and after treatment

Before treatment, *Enterobacteriaceae* with low level of resistance to marbofloxacin were detected in 1 out of 14 YBs in LOW group, and none in HIGH group. In Control group, *Enterobacteriaceae* with high level of resistance to marbofloxacin were detected in 1 out of 20 YBs.

After treatment, bacteria with decreased susceptibility to marbofloxacin were isolated from D10 to D21 in one YB of H group, and from D3 to D40 in two YBs of L group. Bacteria with high level resistance to marbofloxacin were isolated from D7 to D40 in one YB from HIGH group and none in the low group. In Control group, coliforms with high level of resistance to marbofloxacin were detected in 2 out of 20 YBs. The YB harboring resistant strains at D0 was also presenting resistant strain after D0. Resistant *Enterobacteriaceae* were isolated in only two samples of the two other YBs, at D10 and D40 (see table 3).

Tableau 6-3 : Distribution of counts of decreased susceptibility *enterobacteriaceae* over time from day [-10;-3] to day 40, isolated in the faeces of 4 YBs treated and 4 congeners YBs untreated. Treatments with 2 (LOW) or 10 (HIGH) mg/kg marbofloxacin were administered on D0, after faeces sampling.

Fattening unit	N° Animal	Metaphylaxis	Curative treatment	Curative treatment group	Enterobacteriaceae resistant to 0.12 µg/mL marbofloxacin (log10 CFU/g)							Enterobacteriaceae resistant to 4 µg/mL marbofloxacin (log10 CFU/g)						
					D [-10;-3]	D0	D3	D7	D10	D21	D40	D [-10;-3]	D0	D3	D7	D10	D21	0.00
D	111	Y	Y	LOW	<200	<200	4.99	4.51	5.62	4.62	4.61	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200
E	160	Y	Y	LOW	4.68	<200	<200	4.94	2.78	<200	2.48	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200
D	124	Y	Y	HIGH	<200	<200	<200	<200	3.20	3.72	2.30	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200
D	135	Y	Y	HIGH	<200	<200	3.04	5.53	5.88	5.23	3.78	<200	<200	<200	5.53	5.80	5.30	3.76
C	87	N	N	LOW	4.99	-	<200	4.99	<200	<200	4.99	4.99	-	<200	4.99	<200	4.99	<200
A	21	Y	N	LOW	<200	-	<200	<200	<200	<200	<200	<200	-	<200	<200	4.99	<200	<200
C	103	N	N	HIGH	<200	<200	<200	<200	<200	4.99	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200
D	112	Y	N	HIGH	<200	2.90	<200	<200	<200	<200	4.99	<200	-	<200	<200	<200	<200	<200

6.5.2 Experiment VC

6.5.2.1 Bacterial counts and proportion of resistant bacteria

Average counts of total and resistant *Enterobacteriaceae* are given in figure 2. Administration of 10 mg/kg marbofloxacin led to a slight decrease in the average total counts of *Enterobacteriaceae*. At D2, we observed a 1 log₁₀ decrease in HIGH group, whereas we didn't observe a decrease in the LOW group. In the two treated groups, no significant difference in the total counts of *Enterobacteriaceae* was observed over time. Administration of 2 mg/kg marbofloxacin did not affect the number of nalidixic resistant *Enterobacteriaceae*, which remained stable during the study period. Administration of 10 mg/kg marbofloxacin led to a slight decrease in the number of nalidixic resistant *Enterobacteriaceae* at D1, without significant difference compared to the counts obtained before treatment or after D2 (p=0.29). The number of ciprofloxacin resistant isolates were significantly lower before treatment in each groups, compared to the number of susceptible isolates and nalidixic resistant isolates. The number of ciprofloxacin resistant isolates increased significantly from D0 to D5 in the two treated groups over time (p=0.0008). In Control group, a significant increase of two log₁₀ of the average number of ciprofloxacin resistant isolates was also

observed. At D5, only 3 out of 5 calves were collected in Control group, because one calf of the group died between D3 and D5, and one calf could not be sampled.

Administration of marbofloxacin exerted a selective pressure on ciprofloxacin resistant *Enterobacteriaceae* in two days after treatment, whatever the regimen administered. The percentage of resistant *Enterobacteriaceae* increased from 75 and 74% before treatment to 99 and 98% in groups HIGH and LOW at D2, respectively. At D5, this percentage was decreased in LOW group (82%) but not in the HIGH group (98%). Results are presented in figure 3.

6.5.2.2 Numbers of animals harboring resistant strains before and after treatment

Before treatment, all the calves from the three groups presented nalidixic acid and ciprofloxacin resistant *Enterobacteriaceae* in their faeces. At D4 and D5 after treatment, similar results were observed in the three groups.

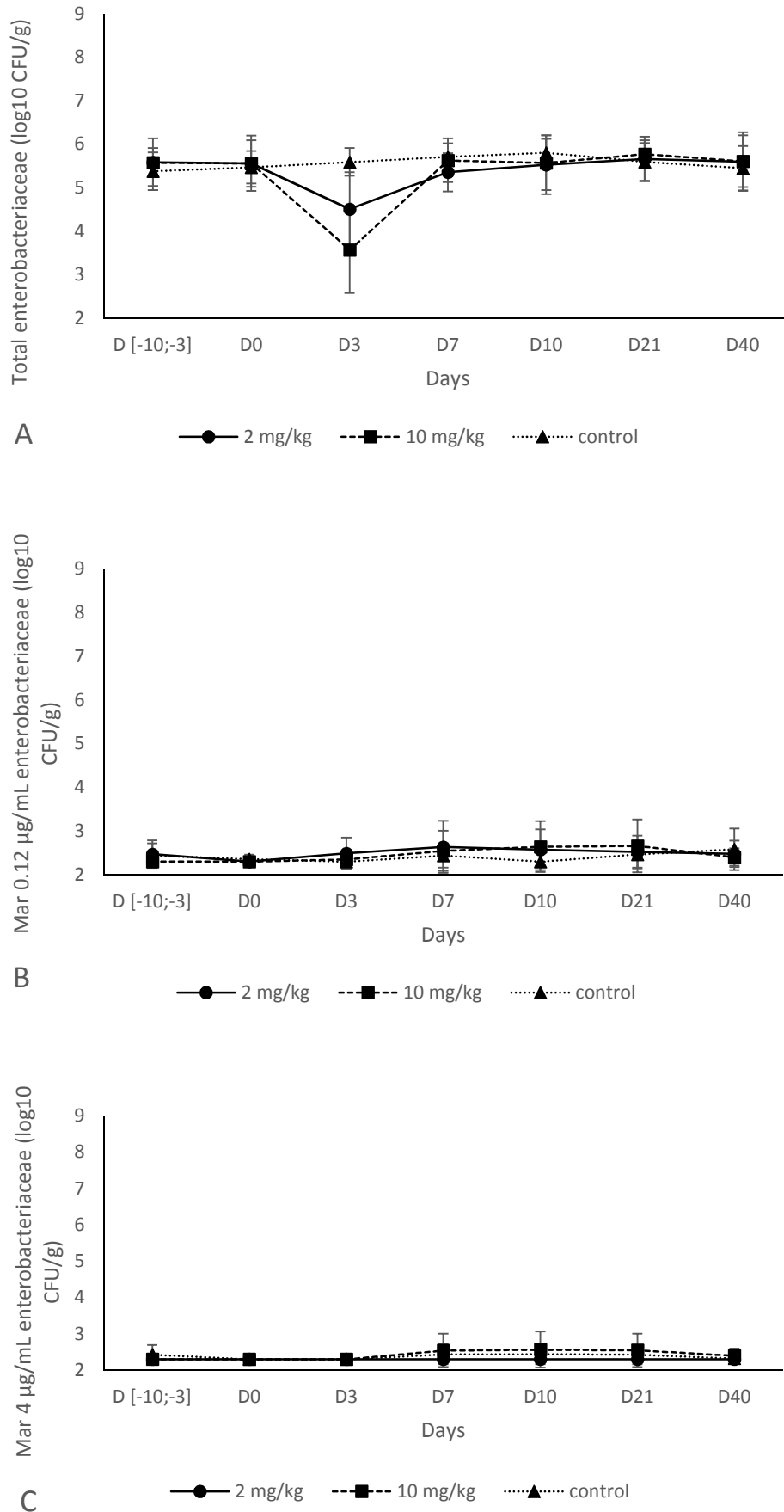


Figure 6-1: log counts of total (A), 0.12 (B) and 4 µg/mL (C) marbofloxacin-resistant *Enterobacteriaceae* in fecal young bulls samples treated with 0, 2 mg/kg or 10 mg/kg of IM marbofloxacin on day 0.

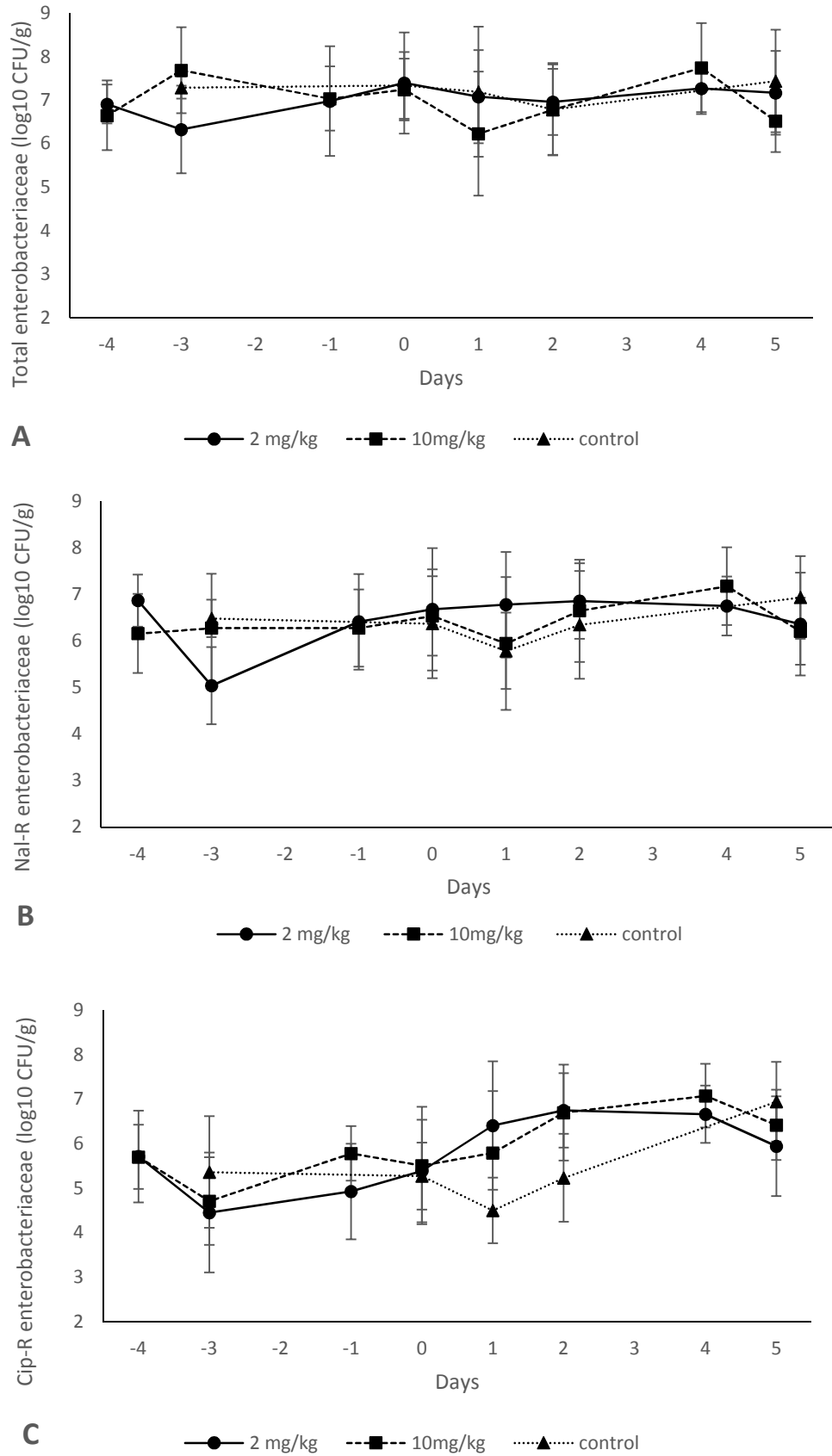


Figure 6-2: log counts of total (A), of 32 µg/ml nalidixic acid - resistant *Enterobacteriaceae* (B) and 2 µg/ml of ciprofloxacin resistant *Enterobacteriaceae* (C) in fecal calves samples treated with 0, 2 mg/kg or 10 mg/kg of IM marbofloxacin on day 0.

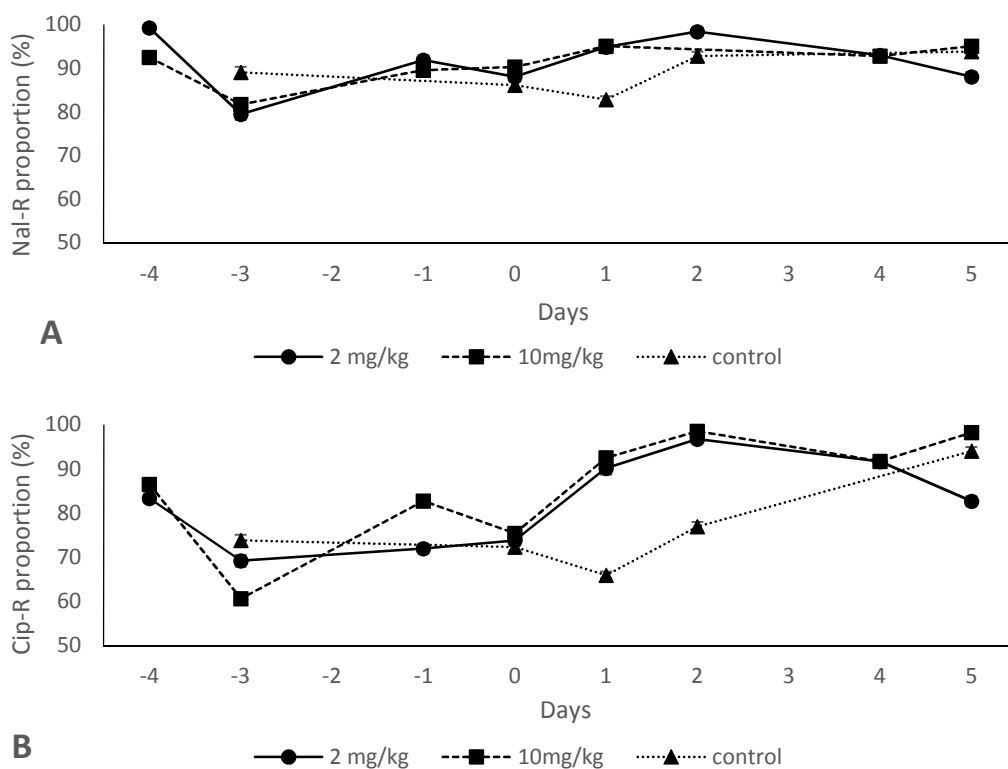


Figure 6-3: Proportions of 32 µg/ml nalidixic acid - resistant *enterobacteriaceae* (A) and 2 µg/ml of ciprofloxacin resistant *enterobacteriaceae* (B) in the faeces of calves untreated or treated with 2 or 10 mg/kg marbofloxacin as a single IM injection on D0, after faeces sampling.

6.6 Discussion

Strong differences in the initial prevalence of fluoroquinolones resistant bacteria were observed between the two animal populations studied. All the pre-ruminant calves but none of the young bulls sampled were found carrying resistant *Enterobacteriaceae* in their faeces. In a previous study conducted in our laboratory (unpublished data) with calves from various origins in France, we also observed such high level of quinolone resistance in commensal *Escherichia coli*. Several studies also reported that pre-weaned calves harbored multiple resistant *E. coli* in gut flora (Berge et al., 2006; Hoyle et al., 2004; Khachatryan et al., 2004; Pereira et al., 2014; Thames et al., 2012). Specifically for fluoroquinolones, some studies report resistance levels of *E. coli* between 10 and 25 percent in Europe (Hordijk et al., 2012). The high resistance prevalence observed in our study could be associated to the fact that calves were treated after birth with antimicrobials. Many studies conducted in calves reported that direct antimicrobial use exerts a selective pressure on commensal bacteria. However, some other factors may influence the presence of resistant gut flora bacteria (Berge et al., 2005; Berge et al., 2006). Several studies assessed the impact of use of discarded milk containing antimicrobials residues for calves' feeding, and pointed out the potential of selection pressure of such practices (Aust et al., 2012; Pereira et al., 2014). Furthermore, Khachatryan et al. (Khachatryan et al., 2004) showed an inverse relationship between the age of animals and the prevalence of fecal resistant *E. coli*. In a field study conducted with adult dairy cows, Mann et al. (Mann et al., 2011) reported a low prevalence of *E. coli* strains resistant to different antimicrobial families. Results of several studies, aggregated in a review, stress that the proportion of resistant *E. coli* isolated from dairy cows differs with the antimicrobial family; as an example, resistance to tetracycline was found to be very common, whereas resistance to ceftiofur was less frequent. A study conducted in Canadian feedlots reported a low prevalence in *E. coli* at the arrival in the fattening units (Checkley et al., 2010). Taken together, all these results are consistent with those observed in our study, showing differences between calves and YBs in the initial level of bacterial resistance.

The results of the experiment VC demonstrated that administration of a single dose of fluoroquinolone exerted a slight selection pressure on *Enterobacteriaceae*. A higher proportion of quinolone resistant *Enterobacteriaceae* in the faeces sampled was observed one day after treatment whatever the regimen. These higher proportions were mainly associated to a decrease in the number of susceptible *Enterobacteriaceae* in treated calves. We observed that a treatment with 10 mg/kg of marbofloxacin induced a transient decrease in the count of total and nalidixic acid resistant *E. coli* between D0 and D2. Total count of ciprofloxacin resistant *Enterobacteriaceae*

slightly increased ($+1\log_{10}$) between D0 and D5, whatever treatment regimen. However, at D5, the count of quinolone sensitive *Enterobacteriaceae* returned to its baseline, showing that treatment did not amplify the number of resistant *Enterobacteriaceae*. Several studies stressed the selective pressure effects of treatments with fluoroquinolones on commensal bacteria, which was consistent with the results of our study (Wiuuff et al., 2003). One study reported that a threefold increase in fluoroquinolones dose did not lead to measurable differences in the probability of selection of resistant bacteria in the human gut flora (Fantin et al., 2009). However, a positive correlation between the antimicrobial dose and the resistant bacteria proportion has been reported in some studies. In an experiment conducted in piglets, Nguyen et al. (Nguyen et al., 2012) observed that the higher was the ciprofloxacin dose administered (1.5 or 15 mg/kg), the higher was the proportion of resistant *Enterobacteriaceae*. Similar results were observed on *Enterobacteriaceae* in an experimental model using rats treated with different doses of cefquinome (Vasseur et al., 2014). Subinhibitory concentrations of antibiotics can also raise selection of resistance, as it has been proved with ciprofloxacin at concentrations lower than MIC in the gut of human volunteers (Fantin et al., 2009). In a study on calves fed with milk containing residues of penicillin, resistance in commensal bacteria increased as the penicillin dose in milk increased (Langford et al., 2003). Even if the correlation between a decrease of antimicrobial dosage and a decrease in the resistant bacteria proportion is still not clear, it might be speculated that a decrease in antimicrobial amount given in animals would limit possible negative impacts on both commensal and environmental floras.

As observed in the experiment **VC**, we observed in the experiment **YB** that a treatment with 2 or 10 mg/kg decreased the total number of *Enterobacteriaceae* in the 3 days after treatment. Marbofloxacin treatment exerted a very low selective pressure on resistant *Enterobacteriaceae*. In the groups LOW and HIGH, 2 out of 14 YBs harbored *Enterobacteriaceae* with decreased susceptibility to marbofloxacin. Only one YB from the High group harbored marbofloxacin resistant *Enterobacteriaceae*. As observed in the experiment **VC**, resistant *Enterobacteriaceae* did not colonize the gut when present, and sensitive *Enterobacteriaceae* flora was restored in 7 days. As the number of YBs harboring resistant strains before treatment was very low, it is probable that marbofloxacin did not allow to select such strains. Moreover no emergence of resistance in *Enterobacteriaceae* was detected over time.

In one YB of the treated group and two YBs of the untreated group harboring resistant *Enterobacteriaceae* before or at D0, we observed that isolation of resistant strains after D0 was not systematically repeated. Hence, it is possible that our methods of sampling and analysis led to

underestimate the presence of resistant strains. However, our method was pretty similar with those observed in several studies assessing the impact of antimicrobials on commensal floras in cattle (Lowrance et al., 2007; Mann et al., 2011). Resistant strains of *Enterobacteriaceae* were isolated after D0 in 2 untreated YBs in which resistant *Enterobacteriaceae* were not present in faeces before D0. Here again, it is possible that our method of isolation of resistant *Enterobacteriaceae* partially failed to isolate such bacteria. However, this observation also suggests that resistant strains have been transmitted between treated and untreated YBs. To further investigate this hypothesis, strain typing will be necessary.

Enterobacteriaceae were chosen as the indicator commensal organism in this study as it is a frequent carcass contaminant at slaughter (Ramos et al., 2013) and constitutes a potential reservoir of resistance genes that might be transferred from animals to humans (Aarestrup and Wegener, 1999; Bywater, 2004; Madec et al., 2012; Wooldridge, 2012). The concentrations of 32 µg/mL of nalidixic acid or 0.12 µg/mL of marbofloxacin and 2 µg/mL of ciprofloxacin or 4 µg/mL of marbofloxacin were retained to isolate *Enterobacteriaceae* with low and high level resistance to fluoroquinolones, respectively. These concentrations are commonly used to perform such experiments (Andraud et al., 2011; Meunier et al., 2004; Pellet et al., 2006). As an example, a trimodal distribution was observed for *E. coli* marbofloxacin MIC in a previous study conducted with mastitis *E. coli* pathogens (Kroemer et al., 2012).

In conclusion, our results suggest that a unique treatment with 2 or 10 mg/kg marbofloxacin exerts a low selective pressure on commensal *Enterobacteriaceae* in Ruminants. Basal level of resistance to fluoroquinolone differed strongly between cohorts, depending on the age of the animals. Such findings highlight that protocols using short acting fluoroquinolones antimicrobials and decreased dosages may limit selection of resistant bacteria possibly transferred to humans. Nevertheless, the possible impact of fluoroquinolones on environmental bacteria, after their shedding in the environment, might encourage their prudent use.

6.7 References

- Aarestrup, F.M., Wegener, H.C., 1999, The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 1, 639-644.
- Agerso, Y., Aarestrup, F.M., 2013, Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs. *J Antimicrob Chemother* 68, 569-572.
- Andraud, M., Chauvin, C., Sanders, P., Laurentie, M., 2011, Pharmacodynamic modeling of in vitro activity of marbofloxacin against *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 756-761.
- Anses 2014. Résapath Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bilan 2013. , Edition scientifique, N., ed. (Anses), p. 168.
- Aust, V., Knappstein, K., Kunz, H.J., Kaspar, H., Wallmann, J., Kaske, M., 2012, Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 97, 1091-1103.
- Berge, A.C., Atwill, E.R., Sisco, W.M., 2005, Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev Vet Med* 69, 25-38.
- Berge, A.C., Moore, D.A., Sisco, W.M., 2006, Field trial evaluating the influence of prophylactic and therapeutic antimicrobial administration on antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* in dairy calves. *Appl Environ Microbiol* 72, 3872-3878.
- Bywater, R.J., 2004, Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51, 361-363.
- Checkley, S.L., Campbell, J.R., Waldner, C.L., Dowling, P.M., Chirino-Trejo, M., 2010, A retrospective diagnostic laboratory survey of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from spring calves in western Canada. *Can Vet J* 51, 1283-1286.
- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludova, L., Borriello, S.P., Price, S., 2013, Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe. *Vet Rec* 173, 475.
- EFSA 2010. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004–2007., p. 261.

- Fantin, B., Duval, X., Massias, L., Alavoine, L., Chau, F., Retout, S., Andreumont, A., Mentre, F., 2009, Ciprofloxacin dosage and emergence of resistance in human commensal bacteria. *J Infect Dis* 200, 390-398.
- Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2011, Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection. *Vet Microbiol* 148, 292-297.
- Heuer, O.E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., Angulo, F.J., 2009, Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis* 49, 1248-1253.
- Hordijk, J., Veldman, K., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Wagenaar, J.A., Mevius, D., 2012, Prevalence and characteristics of quinolone resistance in *Escherichia coli* in veal calves. *Vet Microbiol* 156, 136-142.
- Hoyle, D.V., Knight, H.I., Shaw, D.J., Hillman, K., Pearce, M.C., Low, J.C., Gunn, G.J., Woolhouse, M.E., 2004, Acquisition and epidemiology of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a cohort of newborn calves. *J Antimicrob Chemother* 53, 867-871.
- Kesteman, A.S., Ferran, A.A., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Sanders, P., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2009, Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4740-4748.
- Khachatryan, A.R., Hancock, D.D., Besser, T.E., Call, D.R., 2004, Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Appl Environ Microbiol* 70, 752-757.
- Kroemer, S., Galland, D., Guerin-Fauble, V., Giboin, H., Woehrle-Fontaine, F., 2012, Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Vet Rec* 170, 53.
- Langford, F.M., Weary, D.M., Fisher, L., 2003, Antibiotic resistance in gut bacteria from dairy calves: a dose response to the level of antibiotics fed in milk. *J Dairy Sci* 86, 3963-3966.
- Laxminarayan, R., 2014, Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. *Science* 345, 1299-1301.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O., 2013, Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13, 1057-1098.

- Lowrance, T.C., Loneragan, G.H., Kunze, D.J., Platt, T.M., Ives, S.E., Scott, H.M., Norby, B., Echeverry, A., Brashears, M.M., 2007, Changes in antimicrobial susceptibility in a population of *Escherichia coli* isolated from feedlot cattle administered ceftiofur crystalline-free acid. *Am J Vet Res* 68, 501-507.
- Madec, J.Y., Poirel, L., Saras, E., Gourguechon, A., Girlich, D., Nordmann, P., Haenni, M., 2012, Non-ST131 *Escherichia coli* from cattle harbouring human-like bla(CTX-M-15)-carrying plasmids. *J Antimicrob Chemother* 67, 578-581.
- Mann, S., Siler, J.D., Jordan, D., Warnick, L.D., 2011, Antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* isolates in dairy cows following systemic treatment with ceftiofur or penicillin. *Foodborne Pathog Dis* 8, 861-867.
- McEwen, S.A., Fedorka-Cray, P.J., 2002, Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis* 34 Suppl 3, S93-S106.
- Meunier, D., Acar, J.F., Martel, J.L., Kroemer, S., Valle, M., 2004, Seven years survey of susceptibility to marbofloxacin of bovine pathogenic strains from eight European countries. *Int J Antimicrob Agents* 24, 268-278.
- Nguyen, T.T., Chachaty, E., Huy, C., Cambier, C., de Gunzburg, J., Mentre, F., Andremont, A., 2012, Correlation between fecal concentrations of ciprofloxacin and fecal counts of resistant Enterobacteriaceae in piglets treated with ciprofloxacin: toward new means to control the spread of resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4973-4975.
- Pellet, T., Gicquel-Bruneau, M., Sanders, P., Laurentie, M., 2006, Comparison of faecal and optimal growth conditions on in vitro pharmacodynamic activity of marbofloxacin against *Escherichia coli*. *Res Vet Sci* 80, 324-335.
- Pereira, R.V., Siler, J.D., Bicalho, R.C., Warnick, L.D., 2014, In vivo selection of resistant *E. coli* after ingestion of milk with added drug residues. *PLoS One* 9, e115223.
- Ramos, S., Silva, N., Canica, M., Capelo-Martinez, J.L., Brito, F., Igrejas, G., Poeta, P., 2013, High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: a food safety risk. *J Sci Food Agric* 93, 517-526.
- Riffault, S., Meyer, G., Deplanche, M., Dubuquoy, C., Durand, G., Soulestin, M., Castagne, N., Bernard, J., Bernardet, P., Dubosclard, V., Bernex, F., Petit-Camurdan, A., Deville, S., Schwartz-Cornil, I., Eleouet, J.F., 2010, A new subunit vaccine based on nucleoprotein nanoparticles confers partial clinical and virological protection in calves against bovine respiratory syncytial virus. *Vaccine* 28, 3722-3734.

- Singer, R.S., Finch, R., Wegener, H.C., Bywater, R., Walters, J., Lipsitch, M., 2003, Antibiotic resistance--the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis* 3, 47-51.
- Thames, C.H., Pruden, A., James, R.E., Ray, P.P., Knowlton, K.F., 2012, Excretion of antibiotic resistance genes by dairy calves fed milk replacers with varying doses of antibiotics. *Front Microbiol* 3, 139.
- Trieu-Cuot, P., Derlot, E., Courvalin, P., 1993, Enhanced conjugative transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* 109, 19-23.
- Valle, M., Schneider, M., Galland, D., Giboin, H., Woehrle, F., 2012, Pharmacokinetic and pharmacodynamic testing of marbofloxacin administered as a single injection for the treatment of bovine respiratory disease. *J Vet Pharmacol Ther* 35, 519-528.
- van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A., Kluytmans, J., 2007, Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 13, 1834-1839.
- Vasseur, M.V., Laurentie, M., Rolland, J.G., Perrin-Guyomard, A., Henri, J., Ferran, A.A., Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., 2014, Low or high doses of cefquinome targeting low or high bacterial inocula cure *Klebsiella pneumoniae* lung infections but differentially impact the levels of antibiotic resistance in fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1744-1748.
- Vieira, A.R., Collignon, P., Aarestrup, F.M., McEwen, S.A., Hendriksen, R.S., Hald, T., Wegener, H.C., 2011, Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. *Foodborne Pathog Dis* 8, 1295-1301.
- Wang, H., McEntire, J.C., Zhang, L., Li, X., Doyle, M., 2012, The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. *Rev Sci Tech* 31, 249-260.
- Wiuff, C., Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., Aarestrup, F.M., 2003, The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs. *Res Vet Sci* 75, 185-193.
- Wooldridge, M., 2012, Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Rev Sci Tech* 31, 231-247.

7. CHAPITRE 7. DISCUSSION GENERALE

Rappels des objectifs, principaux résultats, limites et perspectives de recherche, implications

7.1 Rappel des objectifs

L'objectif général de nos recherches consistait à évaluer les possibilités de réduction des quantités d'antibiotique utilisées pour le traitement des bronchopneumonies infectieuses bovines (BPI). Le rationnel de cette approche repose sur des données scientifiques issues de la littérature disponible en antibiothérapie humaine et vétérinaire, qui indiquent que les antibiotiques de la famille des fluoroquinolones ont une activité augmentée en présence d'inocula bactériens de petites tailles. Ce phénomène a comme corollaire que les doses d'antibiotiques efficaces (c.-à-d. assurant une guérison clinique et bactériologique) sont plus faibles lorsque la charge bactérienne d'un individu infecté est faible, par rapport aux doses efficaces lorsque cette même charge bactérienne est plus importante. Nous avons réalisé des études de laboratoire, précédant une étude en conditions de terrain, qui visaient à confirmer cette option de réduction de dose dans des conditions standardisées. Ces études de laboratoire ont bien permis de valider notre hypothèse de réduction de la dose de marbofloxacin efficace face à un inoculum bactérien de petite taille. La dose de marbofloxacin utilisée lors de l'évaluation en conditions de terrain a été fixée par une analyse *in vitro*, et l'activité sur deux modèles animaux de pneumonie, chez la souris et dans l'espèce cible avec un pathogène couramment isolé comme agent de BPI (*M. haemolytica*). L'efficacité d'une dose réduite de marbofloxacin administrée en début d'infection bactérienne sur les guérisons clinique, bactériologique et sur l'intensité des lésions pulmonaires a ainsi été vérifiée expérimentalement. Finalement, l'étude de terrain conduite sur des jeunes bovins à l'engraissement a permis de confirmer la faisabilité de la mise en place d'un protocole thérapeutique associant détection précoce des maladies respiratoires et traitement avec une dose réduite. La quantité globale d'antibiotique utilisée a été mesurée à l'échelle des lots d'animaux inclus dans l'étude. La recherche d'entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones a été conduite sur des prélèvements de matière fécale, collectés sur les bovins ayant reçu de la marbofloxacin au cours des études expérimentales.

7.2 Principaux résultats

7.2.1 Preuve expérimentale de la possibilité de réduction de dose antibiotique nécessaire la guérison d'infections respiratoires dues à des *Pasteurellaceae*

7.2.1.1 Réduction de la dose efficace en fonction du pathogène ciblé

L'activité de la marbofloxacinine a été évaluée *in vitro* chez *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida*, deux espèces bactériennes de la famille des *Pasteurellaceae* et agents étiologiques des BPI. La marbofloxacinine avait des CMI similaires pour les souches testées. Après incubation de *Mannheimia haemolytica* ou *Pasteurella multocida*, Des inocula de 10^8 CFU/mL ont été incubés pendant 24h avec des concentrations différentes de marbofloxacinine (0 à 32x CMI). Une réduction de $3\log_{10}$ de l'inoculum initial a été obtenue à 16x CMI pour *Pasteurella multocida* et 2x CMI pour *Mannheimia haemolytica*.

L'activité de la marbofloxacinine a été testée *in vivo* dans un modèle murin d'infection pulmonaire réalisé par inoculation intratrachéale de 10^9 Unités Formant Colonie (UFC) des deux souches de *Mannheimia haemolytica* ou de *Pasteurella multocida*. Les souris ont été traitées 3h post-challenge par une administration intrapéritonéale unique de marbofloxacinine à différentes doses. Après 48h, les souris ont été euthanasiées et les charges bactériennes pulmonaires quantifiées. Chez les souris non traitées, 15% et 100% de mortalité ont été observés dans les groupes *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* après 48h et une absence de réduction de l'inoculum initial a été observée chez les animaux vivants du groupe *Mannheimia haemolytica*. La marbofloxacinine à 40 mg/kg a provoqué un taux de survie de 100% dans les deux groupes et une réduction d'un facteur mille ($-3\log_{10}$) de l'inoculum initial chez 100% des souris dans le groupe *Mannheimia haemolytica* et 10% dans le groupe *Pasteurella multocida*. Une efficacité supérieure à celle obtenue à 40 mg/kg dans le groupe *Pasteurella multocida* a été observée dans le groupe *Mannheimia haemolytica* avec une dose de 5 mg/kg.

Ces résultats suggèrent qu'indépendamment de la CMI de l'antibiotique, la nature de l'agent étiologique, *Mannheimia haemolytica* ou *Pasteurella multocida*, pourrait être un facteur déterminant de l'efficacité d'un traitement avec une fluoroquinolone.

7.2.1.2 Réduction de la dose efficace en fonction de la taille de l'inoculum et de la précocité du traitement

- *Evaluation in vitro*

L'activité de la marbofloxacinine a été évaluée *in vitro* après incubation de *Mannheimia haemolytica* ou *Pasteurella multocida*, (10^6 et 10^8 CFU/mL) pendant 24h avec des concentrations différentes de marbofloxacinine (0 à 32x CMI).

Pour *M. haemolytica*, nous avons obtenu un effet bactéricide concentration-dépendant. Pour le faible inoculum de 10^6 CFU/mL, la CMB (définie comme la plus petite concentration produisant une réduction de l'inoculum initial $>3 \log_{10}$) était de 0,75x CMI. La marbofloxacinine a éliminé 99,9% des bactéries en 0,5h avec des concentrations supérieures à 2x CMI, en 2h avec 1x CMI et en 4h avec 0,75x CMI. Pour le fort inoculum (10^8 CFU/mL), la marbofloxacinine a éliminé 99,9% des bactéries en 0,5h avec des concentrations $\geq 4x$ CMI, en 1h à 2x CMI, et en 2h à 1x CMI. Ainsi, quelle que soit la taille de l'inoculum initial, la diminution de la taille de l'inoculum de *M. haemolytica* a été obtenue pour des concentrations de marbofloxacinine proches.

Pour *P. multocida*, les résultats obtenus avec le faible inoculum of 10^6 CFU/mL étaient similaires à ceux observés avec *M. haemolytica*. La CMB de la marbofloxacinine était de 1x CMI, même si l'effet était plus lent que pour *M. haemolytica* (élimination $>3\log_{10}$ en 8h). La marbofloxacinine a éliminé 99,9% des bactéries en 0,5h, 1h et 2h avec des concentrations de 8x, 4x et 2x CMI, respectivement. Pour le fort inoculum de 10^8 CFU/mL, la CMB était $\geq 8x$ CMI; la marbofloxacinine a éliminé 99,9% des bactéries en 1h avec une concentration $\geq 16x$ CMI, 2h à 8x CMI. A 4x CMI, une bactéricidie transitoire a été observée pendant les 8 premières heures mais une croissance bactérienne a été observée à 24h. Ainsi avec *Pasteurella multocida*, la diminution de la taille de l'inoculum a été obtenue pour des concentrations de marbofloxacinine plus élevées pour le fort inoculum que pour le faible inoculum.

Ces résultats indiquent que la différence d'activité de la marbofloxacinine face à des gros inocula de *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* observée précédemment se manifeste également par une différence en termes d'effet inoculum : il est absent dans le cas de *Mannheimia haemolytica* (la marbofloxacinine est aussi efficace contre un gros inoculum que contre un petit) et présent dans le cas de *Pasteurella multocida* (la marbofloxacinine est beaucoup plus efficace contre un petit inoculum que contre un gros). Ainsi, si l'on reconnaît que la dose de marbofloxacinine actuellement recommandée assure la guérison des BPI en présence de charges bactériennes

élevées, il est possible d'envisager une réduction de la dose efficace de marbofloxacin pour le traitement des BPI à *M. haemolytica* et *P. multocida*, lorsque les charges bactériennes sont de faible taille.

- *Évaluation in vivo*

L'activité de la marbofloxacin a été évaluée en fonction de la précocité du traitement au cours d'un challenge expérimental d'infection pulmonaire chez le veau. Trente-deux veaux ont été inoculés par voie intratrachéale avec 4×10^7 CFU de *Mannheimia haemolytica* A1, puis successivement inclus dans quatre groupes après une augmentation supérieure à 1°C de leur température rectale, correspondant à un groupe contrôle non traité, et trois groupes traités avec de la marbofloxacin en injection unique : un groupe recevant 2 mg/kg 2h après inclusion, un groupe recevant 2 mg/kg 38h après inclusion, un groupe recevant 10 mg/kg 38h après inclusion.

L'évolution de la charge bactérienne pulmonaire a été suivie par PCR quantitative en temps réel sur des liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA), prélevés avant inclusion, au temps de traitement précoce et tardif et à l'autopsie (110-130 heures après inclusion). A l'autopsie, des fragments de lobes pulmonaires ont également été prélevés et une quantification de *M. haemolytica* a été effectuée par PCR quantitative.

La charge bactérienne a augmenté à chaque prélèvement successif de LBA dans le groupe contrôle, confirmant le modèle infectieux. Le traitement précoce à 2mg/kg, lorsque la charge bactérienne était à 10^4 copies d'ADN/mL de LBA, a permis d'éliminer aussi efficacement et plus rapidement *M. haemolytica* dans le poumon que lors du traitement décalé de 36 heures à 10 mg/kg, lorsque la charge infectieuse était en moyenne de 10^6 copies d'ADN/mL de LBA. Les analyses tissulaires ont permis de mettre en évidence une élimination de la charge bactérienne avec une dose de traitement réduite de 5 fois lors d'une administration précoce.

Ces résultats suggèrent qu'une réduction de la dose de marbofloxacin pour le traitement des infections bactériennes à *M. haemolytica* peut être envisagée, sous réserve d'intervention précoce qui assurerait la présence d'un inoculum bactérien de faible taille.

7.2.2 Preuve de l'intérêt d'un protocole thérapeutique associant détection précoce et dose antibiotique diminuée dans le traitement des BPI spontanées pour réduire la consommation d'antibiotique à l'échelle d'un lot

Cent quatre-vingt-quinze Jeunes Bovins (JB), issus de 6 élevages et répartis dans des lots de 7 à 12 animaux ont été affectés de manière aléatoire à un des groupes expérimentaux E2 et L10, sur la base de la précocité ou non du traitement de BPI (« Early » ou « Late ») et de la dose de marbofloxacin utilisée pour ce traitement (2 ou 10 mg/kg). Une antibiothérapie systématique, en début d'étude, a été réalisée sur les animaux de 3 élevages sur les 6 recrutés. Les JB ont été suivis pendant 30 jours après leur mise en lot. Dans le groupe E2, la température des JB était continuellement suivie à l'aide de thermobolus intraruminaux. Les JB présentant une température ruminale $>40.2^{\circ}\text{C}$ pendant plus de 12h et présentant des signes légers de BPI étaient considérés comme détectés précocement et traités avec 2mg/kg de marbofloxacin. Dans le groupe L10, les JB avec des signes modérés ou graves de BPI étaient considérés comme détectés tardivement et traités avec 10 mg/kg de marbofloxacin. Les rechutes ont été traitées selon les habitudes des éleveurs. La quantité de chaque antibiotique utilisé par kg de JB exposé a été calculée, puis additionnée pour déterminer la quantité totale d'antibiotique utilisée. Le nombre de traitements de première et seconde intention a été enregistré.

Le nombre moyen de doses journalières de marbofloxacin utilisées pour 1000 JB exposés ($\text{TI}_{\text{UDDmarbo}}$) était de 16 dans le groupe E2 et de 43 dans le groupe L10. Le nombre moyen de doses journalières de traitement de 2nde intention pour 1000 JB exposés ($\text{TI}_{\text{UDDtula-flor}}$) était de 25 dans le groupe E2 et de 3 dans le groupe L10. Au total, le nombre moyen de doses journalières utilisées pour 1000 JB exposés ($\text{TI}_{\text{UDDtotal}}$) était de 40 dans le groupe E2 et de 46 dans le groupe L10. La proportion d'animaux ayant reçu des traitements de première et seconde intention était plus importante (45 et 37%) dans le groupe E2 que dans le groupe L10 (25 et 7%). 97 et 100% des JB traités dans les groupes E2 et L10 étaient guéris à la fin de l'étude. Dans les élevages ayant implémenté une antibiothérapie systématique, la quantité d'antibiotiques utilisée pour ce traitement représentait 90% de la quantité totale d'antibiotiques utilisée.

Ces résultats suggèrent que l'association d'un système de détection précoce de maladie et de l'utilisation d'une dose antibiotique diminuée par rapport à la dose actuellement recommandée peut permettre de réduire la consommation globale d'antibiotique au niveau de l'élevage, sans affecter l'efficacité du traitement. Cet effet serait indépendant de la mise en place ou non d'une stratégie d'antibiothérapie systématique en début d'engraissement.

7.2.3 Impact de la marbofloxacin sur les entérobactéries chez le veau et le jeune bovin

L'impact d'une administration unique de deux doses de marbofloxacin sur la sélection d'entérobactéries résistantes a été évalué. Quarante-huit jeunes bovins (JB) et 32 veaux ont reçu une administration intramusculaire de 2 ou 10 mg/kg de marbofloxacin. Les fèces des animaux ont été collectées de manière répétée avant et après l'injection d'antibiotique, durant 5 jours pour les veaux et 40 jours pour les JB. La présence d'entérobactéries de sensibilité diminuée et résistantes aux fluoroquinolones a été recherchée par étalement sur géloses Mac Conkey, en absence ou en présence d'une concentration fixe d'antibiotique (concentrations critiques définies par le CA-SFM).

Avant le traitement, les dénombrements d'entérobactéries totales étaient similaires dans les groupes contrôle et traité de chaque catégorie de bovins. Tous les veaux, mais seulement 4 JB inclus dans l'expérimentation, étaient porteurs d'entérobactéries résistantes. Dans les 3 jours suivant le traitement, une diminution modérée et transitoire du nombre d'entérobactéries totales a été observée chez les veaux et les JB traités, quelle que soit la posologie. Le nombre d'entérobactéries totales est revenu à son niveau de base 7 jours après le traitement. Une faible sélection de bactéries résistantes a été observée, quels que soient le traitement ou la catégorie d'animaux. Cinq jours après le traitement, les veaux étaient tous porteurs de bactéries résistantes aux fluoroquinolones, mais leur proportion n'avait pas augmenté de manière significative au cours du temps. Chez les JB, seul un animal traité avec 10 mg/kg de marbofloxacin était porteur d'entérobactérie résistante à la marbofloxacin à J40.

Au final, ces résultats montrent qu'une injection unique de 2 ou 10 mg/kg de marbofloxacin a exercé une faible sélection sur les entérobactéries de la flore commensale de veaux et de jeunes bovins. Ce phénomène doit être mis en perspective avec les caractéristiques du portage d'entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones dans les deux groupes de bovins.

7.3 Limites et perspectives de recherche

7.3.1 Impact d'une dose diminuée sur la sélection de bactéries résistantes aux FQ

Dans nos différents travaux, nous avons montré la possibilité de réduction de la dose de marbofloxacin utilisée lors d'un traitement précoce de BPI. Les enjeux de santé publique font de l'évaluation de l'impact des traitements antibiotiques sur la flore commensale une question majeure (Oliver et al., 2011). Nos travaux ont montré que la marbofloxacin en dose unique

exercerait une pression de sélection faible sur les entérobactéries résistantes, pour les deux doses testées. Ce résultat doit être mis en relation avec les caractéristiques du portage d'entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones dans les deux groupes de bovins étudiés, issus d'élevages conventionnels. Le portage massif d'entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones chez des veaux âgés de 2-3 semaines pose question ; la non détection d'entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones chez des JB de plus de 7 mois est également à remarquer.

Dans la littérature, plusieurs études ont rapporté la présence d'entérobactéries résistantes excrétées dans les fèces de bovins préruminants (Khachatryan et al., 2004; Berge et al., 2005; Pereira et al., 2014). Le recrutement de très jeunes veaux dans notre étude pourrait expliquer en partie la forte excrétion de résistance que nous avons constatée. De nombreux facteurs environnementaux peuvent impacter la colonisation du tube digestif de jeunes animaux par des souches d'entérobactéries résistantes ainsi que le niveau d'excrétion fécale de ces souches. Par exemple, des travaux ont montré que des veaux nouveau-nés subissaient des colonisations successives par des souches résistantes, probablement à partir d'une source environnementale, et qui étaient propagées entre les veaux de la cohorte au cours du temps (Hoyle et al., 2004). Il semble important, dans un contexte de préservation de la santé publique, de comprendre et d'analyser les facteurs expliquant les niveaux de portage d'entérobactéries résistantes chez le veau.

L'évolution de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries de la flore commensale peut être suivie, par des techniques microbiologique (évaluation des CMI) (Belloc et al., 2005; Mann et al., 2011) ou de biologie moléculaire (recherche de gènes de résistance) (Damborg et al., 2012; Hansen et al., 2012). Cette évaluation fait l'objet de travaux de recherches, qui s'intéressent aux soit à des bactéries indicatrices dont le suivi va donner des indications sur la sensibilité de la flore, soit aux bactéries zoonotiques, ce qui peut rendre complexe l'extrapolation des résultats. A ce jour, il existe peu de données permettant d'apprécier des différences entre schémas thérapeutiques au niveau de la sensibilité des bactéries de la flore commensale (Wiuff et al., 2003; Nguyen et al., 2012; Zaheer et al., 2013). La relation entre les doses d'antibiotiques et l'émergence de résistances bactériennes dans les flores commensales n'est pas univoque. L'émergence de résistances a été observée au sein de flores pharyngées et intestinales de volontaires sains traités avec de la ciprofloxacine, quel que soit la dose utilisée (Fantin et al., 2009). Chez des porcs traités avec de l'enrofloxacin, des variations de doses d'un facteur 2 n'ont pas permis de diminuer la sélection de bactéries coliformes du tube digestif (Wiuff et al., 2003). Par contre, il a été montré également chez le porc, qu'une dose de ciprofloxacine diminuée d'un facteur 10 limitait l'amplification d'entérobactéries résistantes au sein du microbiote intestinal (Nguyen et al., 2012). Des résultats similaires ont été

observés par Vasseur et al. avec deux doses de cefquinome (facteur 10), dans un modèle rongeur d'infection à *Klebsiella pneumoniae* (Vasseur et al., 2014). Au-delà du niveau de dose, la durée de traitement et la demi-vie d'élimination des antibiotiques semble influencer sur la sélection de bactéries résistantes. L'intérêt d'une réduction du temps de traitement a été démontré (Zhao and Drlica, 2001). Par exemple, l'utilisation chez l'enfant de l'azithromycine, un macrolide à demi-vie d'élimination longue, exerce une pression de sélection plus importante sur les bactéries de la flore oro-pharyngée qu'un macrolide éliminé plus rapidement (Kastner and Guggenbichler, 2001).

Lors de nos recherches, nous n'avons pas mesuré l'impact d'un traitement avec une dose répétée de marbofloxacin, correspondant à la posologie lors du premier enregistrement de Marbocyl® (2 mg/kg, 3 à 5 jours). Il est possible qu'une telle administration répétée ait pu exercer une pression de sélection plus forte qu'une administration unique. Pour répondre à cette question, l'étude de l'impact de cette posologie pourrait être conduite, en suivant une méthodologie similaire à celle utilisée dans nos travaux. D'autre part, nous avons utilisé la marbofloxacin pour la mise en évidence de la possibilité de réduction de la dose antibiotique utilisée dans le traitement des maladies respiratoires. Une réduction de la dose d'une autre famille antibiotique, envisagée des conditions d'utilisation similaires (intervention précoce, inoculum bactérien faible) pourrait être associée à un gain majeur pour limiter la sélection de bactéries résistantes.

7.3.2 Facteurs influençant l'efficacité du protocole antibiotique à dose réduite

Au cours de l'étude de terrain, nous avons observé que la proportion de traitements curatifs était augmentée dans les groupes détectés précocement par rapport aux groupes détectés tardivement. Nous avons également observé une augmentation des échecs thérapeutiques, attestés par le recours plus important aux traitements de seconde intention dans les groupes à traitement précoce. L'augmentation de ces échecs soulève la question de la précision d'un protocole thérapeutique associant détection précoce et dose diminuée, qui peut se décomposer en deux sous-questions étroitement liées: l'identification précise de l'agent étiologique, et le moment de déclenchement du traitement. L'influence de la taille de l'inoculum bactérien sur l'activité bactéricide de la marbofloxacin a été montrée dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, dans chacune de ces études, l'espèce bactérienne et la taille de l'inoculum étaient connues, ce qui n'était pas le cas dans notre dernière étude. Bien que les bactéries et en particulier les Pasteurelles soient des agents fréquemment identifiés dans les BPI en France (Assie et al., 2009), Amérique du Nord (Rice et al., 2007; Confer, 2009; Fulton, 2009) et Australie (Cusack et al., 2003), des virus sont également

souvent isolés, et peuvent être responsables de BPI avec des signes cliniques proches de ceux observés lors de BPI bactériennes. Ainsi, notre méthode de détection ne permet pas de déterminer l'origine du pathogène, car l'hyperthermie et les signes cliniques observés sur les animaux inclus ne sont pas pathognomiques d'infection respiratoire bactérienne (Timsit et al., 2011). Il est possible que certains animaux traités n'aient pas présenté pas d'infection bactérienne.

D'autre part, notre approche repose sur l'hypothèse que l'intensité des signes cliniques est peu ou prou corrélée avec la taille de la charge bactérienne. Alors que des travaux précédemment réalisés sur les modèles de pneumonies chez les rongeurs (Kesteman et al., 2009 ; Ferran et al., 2009, 2011 ; Vasseur et al., 2014), ainsi que notre modèle de pneumonie chez le veau, confirment cette corrélation, il était impossible de renseigner la taille de l'inoculum au site infectieux dans les conditions de l'étude de terrain. Il est donc possible que le moment de déclenchement du traitement avec la dose réduite ait été trop tardif. Dans ce cas, les JB traités étaient bien porteurs de bactéries, mais le stade plus avancé de l'infection ne permettait pas d'utiliser une dose diminuée de marbofloxacin.

Le cas des traitements trop précoces rejoint la situation précédente, où des agents viraux seraient la cause des premiers symptômes. Il est communément admis que les infections virales précèdent et préparent des surinfections bactériennes, mais l'utilisation en injection unique de la marbofloxacin, qui présente une demi-vie d'élimination relativement rapide (Ismail and El-Kattan, 2007), ne permet de conserver une activité bactéricide que pendant une fenêtre de temps relativement courte.

Dans les deux cas, l'incertitude sur le moment de déclenchement du traitement est associée à l'absence d'outils permettant (i) d'identifier rapidement les pathogènes (virus ou bactéries) responsables d'infection respiratoire et (ii) d'évaluer la charge bactérienne au site infectieux. En l'absence de ces informations, nous avons défini un seuil sur la base des informations observées dans la deuxième expérimentation et des données de la littérature, pour déclencher le traitement précoce dans notre étude (élévation de la température ruminale au-delà de 40.2°C pendant plus de 12h consécutives confirmée par un examen clinique) (Schaefer et al., 2007;Timsit et al., 2011). Notre approche de type « boîte noire » a tout de même permis de mettre en évidence la possibilité de mise en place d'un traitement précoce avec une dose diminuée. Plus la précision des conditions d'utilisation des antibiotiques sera importante, plus la dose d'antibiotique pourra être adaptée, afin d'éviter des expositions inutiles et de limiter le nombre de rechutes. En ce sens, les recherches à mener en priorité doivent viser la mise à disposition d'outils permettant d'identifier les pathogènes, et l'identification de marqueurs d'infection précoce à l'échelle individuelle.

7.3.3 Réduction des quantités d’antibiotiques utilisées pour le traitement des BPI

7.3.3.1 Réduction de l’antibiothérapie systématique

Dans notre dernière étude, nous avons observé deux phénomènes conduisant à une augmentation des quantités d’antibiotique utilisées. Premièrement, nous avons démontré qu’au final l’antibiothérapie systématique en début d’engraissement conduisait à une exposition accrue des animaux aux antibiotiques. En effet l’antibiothérapie systématique a permis de limiter le nombre de traitements curatifs, mais insuffisamment pour compenser le niveau d’exposition de l’ensemble du groupe. De plus, l’antibiothérapie systématique a concerné des animaux qui n’auraient pas nécessité de traitements. Au final, le rapport bénéfice sur risque de l’antibiothérapie systématique, tel que défini pour la métaphylaxie dans les chapitres introductifs, se révèle défavorable pour cette pratique. Bien que notre étude n’ait été réalisée que dans un faible nombre d’élevages, il semble important de confirmer ces résultats, et de documenter les situations où le recours systématique aux antibiotiques pourrait se révéler nécessaire, et celles où il serait manifestement superflu. Une étude des facteurs de risque d’apparitions de BPI en élevage pourrait être menée, afin de dégager des situations types d’usage, mais aussi de déterminer avec les éleveurs les points de maîtrise permettant à terme et sous conditions de supprimer les pratiques d’antibiothérapie systématique.

7.3.3.2 Réduire les doses d’autres familles d’antibiotiques

Dans la partie expérimentale, nous nous sommes focalisés sur l’étude de l’efficacité de la marbofloxacin. L’efficacité d’une dose réduite de marbofloxacin sur un faible inoculum bactérien, dans les premiers stades d’évolution de la maladie a été observée. Compte tenu du mode d’action des antibiotiques de la famille des fluoroquinolones, il est probable que les résultats obtenus avec la marbofloxacin soient extrapolables à l’ensemble des fluoroquinolones pour les germes étudiés. Certaines études *in vitro* ont également mis en évidence la présence d’un effet inoculum avec *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, ou *Staphylococcus aureus* sur l’activité de la marbofloxacin ou de la ciprofloxacin (Mizunaga et al., 2005; Ferran et al., 2009; Kesteman et al., 2009; Ferran et al., 2011).

L’influence de la taille initiale de l’inoculum sur l’activité antibactérienne a été rapportée avec d’autres familles d’antibiotique, telles que les pénicillines, céphalosporines ou les carbapénèmes (Eagle, 1949; Mizunaga et al., 2005; Bulitta et al., 2009; Vasseur et al., 2014). Compte tenu de la fréquence des usages d’autres familles pour le traitement des maladies respiratoires, il pourrait être

intéressant d'étudier la reproductibilité des résultats obtenus avec ces familles. En médecine vétérinaire, les familles des pénicillines et des macrolides pourraient être prioritairement ciblées, en raison des volumes utilisés et des caractéristiques des molécules (Apley, 1997; Nickell and White, 2010).

7.3.3.3 Réduire les doses de marbofloxacin dans le traitement des maladies respiratoires bovines

Compte tenu de la forte implication des Pasteurelles dans les BPI bovines (Fulton, 2009), nous avons choisi d'étudier l'efficacité de la marbofloxacin sur un nombre limité de souches de *P. multocida* et *M. haemolytica*. Les souches choisies devaient représenter les souches les plus communément rencontrées sur le terrain. En effet leur CMI de 0.03 µg/mL était égale à la CMI 90% rapportée dans un suivi épidémiologique européen (Kroemer et al., 2012) ; d'autre part, le sérotype A1 de *M. haemolytica* constitue le sérotype le plus fréquemment isolé dans l'espèce bovine, et le plus pathogène (Zecchinon et al., 2005; Rice et al., 2007; Confer, 2009; Singh et al., 2011). Compte tenu de la pharmacocinétique de la marbofloxacin, il est probable que les résultats observés soient reproductibles avec des pathogènes des mêmes espèces et de CMI plus élevée, dans la mesure où elles restent sensibles à l'antibiotique.

Lors d'une administration de 2 mg/kg de marbofloxacin, les valeurs des pics de concentrations (C_{max}) et d'aires sous la courbe des concentrations (AUC) mesurées chez des JB sains étaient respectivement de 1.4 µg/mL et 12 µg.h/mL (Ismail and El-Kattan, 2007). Ainsi, pour une souche de *M. haemolytica* de CMI égale 1 µg/mL, la dose de 2 mg/kg permettrait d'atteindre des valeurs de C_{max}/CMI de 46 et d'AUC/CMI de 400, qui sont au-delà des valeurs seuils prédictives d'efficacité communément admises pour les fluoroquinolones (respectivement 10 et 125) (Forrest et al., 1993; Craig, 1998; Toutain et al., 2002).

D'autres bactéries peuvent être isolées comme agent de BPI : des Gram – (*Histophilus somni*, *Salmonella*, *Escherichia coli*), des Gram + (*Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*)), et *Mycoplasma bovis*. Les CMI 90% des bactéries Gram – sont équivalentes à celles des pathogènes étudiés dans nos études (Anses, 2014). Il est donc probable qu'une dose réduite de marbofloxacin permettrait d'éliminer ces bactéries, lors d'intervention sur un faible inoculum. En cas d'intervention tardive, la présence d'un effet inoculum, décrit avec d'autres espèces bactériennes comme *E. coli* ou *Klebsiella*, ainsi que les résultats obtenus dans notre 2^{ème} étude expérimentale invite à la prudence. Une telle réduction ne pourrait s'envisager qu'en ayant documenté les effets de la marbofloxacin sur les espèces cibles, et en possession de moyens de diagnostic de l'espèce pathogène. Pour les bactéries Gram +, l'activité de la marbofloxacin est

décrite comme temps-dépendante (Spreng et al., 1995). Il est envisageable d'ajuster la dose antibiotique nécessaire en fonction de la CMI des bactéries, mais la posologie restera dans ce cas contrainte par le temps de contact entre la marbofloxacin et les pathogènes.

7.4 Implications en antibiothérapie vétérinaire

7.4.1 Les enjeux de la médecine vétérinaire de précision : réduire le nombre d'animaux exposés inutilement aux antibiotiques ou surexposés

En médecine humaine, la médecine de précision se définit comme une forme de médecine construite sur les informations relatives aux gènes ou aux protéines du patient, ou encore à son environnement afin d'être plus prédictive en identifiant les prédispositions, d'affiner les diagnostics et d'accroître les chances de guérison du patient, en augmentant par exemple l'efficacité des traitements (Feero and Guttmacher, 2014;Peer, 2014). Un concept assez proche existe au sein du monde agricole. L'agriculture de précision est un concept apparu à la fin du XXème siècle, qui consiste à optimiser les rendements des parcelles par rapport aux investissements et aux impacts environnementaux des pratiques (McBratney et al., 2005). L'agriculture de précision s'intéresse à la variabilité du milieu à travers des technologies numériques (cartographie satellite, systèmes d'alarmes climatiques et épidémiques), afin de fournir aux agriculteurs des outils d'aides aux décisions. Ces outils permettent par exemple de limiter les quantités d'engrais ou de produits phytosanitaires nécessaires aux cultures. L'élevage de précision, quant à lui, se définit comme « l'utilisation de technologies permettant de suivre des indicateurs physiologiques, comportementaux ou de production sur les animaux pour améliorer les stratégies de management du troupeau et les performances de l'élevage» (Bewley and Russell, 2010). Les données enregistrées par les capteurs mesurant les indicateurs sus-cités sont ensuite stockées, analysées et mises en perspective pour fournir à l'éleveur des aides à la décision. A ce jour, l'analyse des variables étudiées en élevage vise principalement à fournir aux éleveurs des outils d'aides à la décision pour améliorer les performances zootechniques des animaux (Allain et al., 2014).

Le protocole de détection implémenté dans notre dernière étude se situe à la frontière des concepts d'élevage de précision et de médecine de précision. Le recours à un outil de monitoring individuel d'une variable biologique associée à l'état de santé des animaux a permis d'optimiser les quantités d'antibiotiques utilisées par rapport à un objectif de préservation de l'efficacité des antibiotiques. En effet, la mise en place de la thérapeutique a été basée sur l'analyse de la température ruminale en continu ; elle s'est donc affranchie de l'imprécision de mesure inhérente à la subjectivité des

observations qui auraient pu être faites par l'éleveur. Toutefois, les valeurs prédictives positive et négative du critère de décision restent à déterminer. Nos résultats, bien que produits avec des effectifs réduits et dans un système spécifique, présentent un caractère innovant, et devraient ouvrir la voie à de futures recherches dans ce domaine.

L'évaluation de l'intérêt économique de telles stratégies, pouvant dans le cadre de l'antibiothérapie intégrer le coût de l'externalité lié à la sélection de bactéries résistantes, serait à coup sûr un accélérateur de la mise en place de ces pratiques en élevage.

7.4.2 Rôle des pouvoirs publics dans le soutien à l'innovation en antibiothérapie vétérinaire

En médecine vétérinaire, les principales voies d'innovation en terme d'antibiothérapie se sont jusqu'ici portées sur l'optimisation de la galénique afin de simplifier l'administration et ainsi améliorer l'observance des traitements. Elles répondent à un besoin des utilisateurs (De Briyne et al., 2013). Par exemple, les formulations longue action d'antibiotiques phénicolés ou de macrolides utilisées dans le traitement des BPI, ont été développées pour faciliter l'observance du traitement par l'éleveur, la contention des JB étant souvent difficile. Par ailleurs, les contraintes liées à la commercialisation des denrées alimentaires ont orienté l'innovation vers des médicaments à temps d'attente lait/viande les plus courts possibles (voire nul pour certains antibiotiques). Ces innovations sont en phase avec les attentes des prescripteurs, comme le rapporte une enquête européenne qui identifie la facilité d'administration et le temps d'attente lié aux résidus pour les animaux de production comme des facteurs majeurs de choix des traitements (De Briyne et al., 2013).

Aujourd'hui, les perspectives d'innovation, répondant à un besoin collectif et prioritaire de réduction de l'impact de l'antibiothérapie animale sur la santé publique sont de 2 types, tout en étant fondées sur la même approche qui consiste à limiter au maximum l'impact de l'antibiotique sur les flores commensales (et tout particulièrement la flore digestive) de l'animal traité sans pour autant réduire son efficacité curative sur l'infection bactérienne ciblée (Toutain et al., 2015). Elles passent soit par la réduction des doses d'antibiotiques utilisés, comme nous l'avons étudié, soit par la découverte d'antibiotiques « verts » ou « écologiquement responsables », signifiant que leur impact sur l'ensemble des flores non pathogènes animales et environnementales est nul (Toutain et al., 2015). Dans les deux cas, ces innovations devraient être encouragées par des politiques publiques qui assurent à la fois à l'industrie pharmaceutique, aux praticiens vétérinaires et aux éleveurs, une visibilité sur les potentiels créneaux de recherche et une durabilité des pratiques en cas de succès de développement (Laxminarayan, 2014). Les pouvoirs publics pourraient

encourager l'innovation en antibiologie à l'aide de plusieurs leviers. Au niveau réglementaire, il pourrait être envisagé un statut particulier pour les médicaments antibiotiques et toute autre alternative limitant la sélection des bactéries résistantes, avec l'objectif d'assurer une évaluation prioritaire des dossiers de demande d'AMM, par exemple en prolongeant la protection des données de l'AMM pour le médicament porteur de l'innovation. Compte tenu du contexte de santé publique et des durées incompressibles de développement des produits, les pouvoirs publics peuvent également fournir aux industriels une visibilité sur l'avenir de la molécule développée. Par exemple, développer un antibiotique d'importance non critique avec le risque qu'il devienne critique au moment de sa mise sur le marché est un risque difficile à assumer. Enfin, les évolutions réglementaires devraient permettre d'encourager et de protéger les innovations faites avec des molécules déjà mises sur le marché. En parallèle, des actions incitatives peuvent encourager l'innovation. Par exemple, la mise en place de prêts sur fonds dédiés finançant les programmes de R&D, remboursables en cas de succès à l'enregistrement du produit en Europe. Cela permettrait de partager le risque associé au développement d'un anti-infectieux d'une nouvelle classe pour la santé animale, entre la société dans son ensemble et l'industriel. Par ailleurs, la multiplication des bourses d'études pour les instituts de recherche publique Français et Européens sur des projets de recherche ou de développement en partenariat avec l'industrie peut être envisagée.

Au niveau mondial, les filières de production animales sont de fortes consommatrices d'antibiotiques, utilisés soit pour un usage thérapeutique, soit comme facteur de croissance (Pagel and Gautier, 2012). Ces usages génèrent un risque de sélection de bactéries résistantes, potentiellement transmissibles à l'homme. Les deux dernières décennies ont vu la problématique de l'antibiorésistance en santé humaine et en santé animale évoluer du champ de l'expertise scientifique au champ politique. Ainsi, les principaux acteurs politiques internationaux se mobilisent aujourd'hui pour encadrer la mise sur le marché et les usages des antibiotiques (Aidara-Kane, 2012). Les nombreux mécanismes de sélection et dissémination des bactéries résistantes aux antibiotiques, les enjeux économiques associés à leurs usages, et la forte hétérogénéité entre les politiques publiques nationales concernant la mise sur le marché et l'usage des antibiotiques, rendent complexes d'une part la quantification du risque pour la santé publique associé à l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire, et d'autre part la mise en place de mesures de gestion du risque au niveau mondial. Une des actions prioritaires doit consister en la mesure des dommages associés à l'usage des antibiotiques (Laxminarayan and Brown, 2001). Comme ces dommages

sont décalés dans le temps, un consensus d'experts et de citoyens doit être recherché concernant les hypothèses de calcul, en particulier concernant le taux d'actualisation des dommages futurs (Vagsholm and Hojgard, 2010). Simultanément, les déterminants de l'antibiorésistance se doivent d'être mieux investigués, en évaluant l'ensemble des stratégies de traitements possibles (e.g. curatif vs préventif ; posologies optimisées ; choix d'un antibiotique critique ou non). Ces diverses connaissances demeurent nécessaires pour éclairer la prise de décision publique. Les travaux d'une commission d'experts internationaux ont identifié les principaux points de maîtrise pour lutter contre l'antibiorésistance (Laxminarayan et al., 2013). Ceux-ci sont de plusieurs ordres : tout d'abord, des partenariats mondiaux dans lesquels les décideurs politiques, les universitaires, et les professionnels de tous les secteurs collaborent doivent être mis en place. Ils doivent viser au développement de nouveaux antibiotiques ou d'alternatives aux antibiotiques, et de tests de diagnostic rapides. Deuxièmement, et plus spécifiquement dans le secteur des productions animales, les usages inutiles d'antibiotiques doivent être évités, afin de limiter la sélection de résistances bactériennes en médecine vétérinaire et la présence de résidus actifs dans l'environnement. A ce titre, les organisations internationales (Organisation Mondiale de la Santé, Office International des Epizooties et Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) doivent fournir un cadre clair, d'une part définissant les usages préventifs et curatifs, d'autre part définissant les modalités de collecte des données concernant les consommations d'antibiotiques. Les différents gouvernements pourraient alors réviser les législations existantes en conséquence. Troisièmement, les différentes parties prenantes (organisations internationales, industrie pharmaceutique, agriculteurs, vétérinaires, universitaires, société civile) doivent travailler ensemble pour identifier et mettre en œuvre des incitations pour le développement de systèmes de santé limitant les maladies dans les élevages d'animaux de rente. De manière opérationnelle, et compte tenu de la complexité de la problématique de l'antibiorésistance, tous les leviers permettant de réduire les usages des antibiotiques, qui ont été abordés dans le chapitre 2 de ce travail de thèse, à travers l'exemple des politiques publiques implémentées en France, doivent être mobilisés. Notre étude expérimentale illustre une possibilité d'action sur le versant de l'optimisation de l'antibiothérapie, qui considère les contraintes pratiques et économiques des utilisateurs finaux. Elle devrait contribuer à la conscientisation du risque associé à l'usage des antibiotiques auprès des prescripteurs et des utilisateurs, et poser des bases pour rationaliser les stratégies de traitement antibiotique en productions animales.

7.5 Références

- Aidara-Kane, A. (2012). Containment of antimicrobial resistance due to use of antimicrobial agents in animals intended for food: WHO perspective. *Rev Sci Tech* 31, 277-287.
- Allain, C., Chanvallon, A., Clement, P., Guatteo, R., and Bareille, N. (Year). "Elevage de précision : périmètre, applications et perspectives en élevage bovin", in: *Renc. Rech. Ruminants*, 2014, 21), 8.
- Anses (2014). "Résapath Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bilan 2013. " (ed.) N. Edition Scientifique. Anses).
- Apley, M. (1997). Antimicrobial therapy of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13, 549-574.
- Assie, S., Seegers, H., Makoschey, B., Desire-Bousquie, L., and Bareille, N. (2009). Exposure to pathogens and incidence of respiratory disease in young bulls on their arrival at fattening operations in France. *Vet Rec* 165, 195-199.
- Belloc, C., Lam, D.N., Pellerin, J.L., Beaudeau, F., and Laval, A. (2005). Effect of quinolone treatment on selection and persistence of quinolone-resistant *Escherichia coli* in swine faecal flora. *J Appl Microbiol* 99, 954-959.
- Berge, A.C., Atwill, E.R., and Sischo, W.M. (2005). Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev Vet Med* 69, 25-38.
- Bewley, J.M., and Russell, R.A. (Year). "In Proc. First North Am." in: *Conf. Precis. Dairy Manag.*).
- Bulitta, J.B., Ly, N.S., Yang, J.C., Forrest, A., Jusko, W.J., and Tsuji, B.T. (2009). Development and qualification of a pharmacodynamic model for the pronounced inoculum effect of ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 46-56.
- Confer, A.W. (2009). Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev* 10, 145-148.
- Craig, W.A. (1998). Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* 26, 1-10; quiz 11-12.
- Cusack, P.M., Mcmeniman, N., and Lean, I.J. (2003). The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J* 81, 480-487.
- Damborg, P., Marskar, P., Baptiste, K.E., and Guardabassi, L. (2012). Faecal shedding of CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum antimicrobial prophylaxis after hospital admission. *Vet Microbiol* 154, 298-304.

- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludova, L., Borriello, S.P., and Price, S. (2013). Factors influencing antibiotic prescribing habits and use of sensitivity testing amongst veterinarians in Europe. *Vet Rec* 173, 475.
- Eagle, H. (1949). The effect of the size of the inoculum and the age of the infection on the curative dose of penicillin in experimental infections with streptococci, pneumococci, and *Treponema pallidum*. *J Exp Med* 90, 595-607.
- Fantin, B., Duval, X., Massias, L., Alavoine, L., Chau, F., Retout, S., Andremont, A., and Mentre, F. (2009). Ciprofloxacin dosage and emergence of resistance in human commensal bacteria. *J Infect Dis* 200, 390-398.
- Feero, W.G., and Guttmacher, A.E. (2014). Genomics, personalized medicine, and pediatrics. *Acad Pediatr* 14, 14-22.
- Ferran, A.A., Kesteman, A.S., Toutain, P.L., and Bousquet-Melou, A. (2009). Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the influence of inoculum size on the selection of resistance in *Escherichia coli* by a quinolone in a mouse thigh bacterial infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3384-3390.
- Ferran, A.A., Toutain, P.L., and Bousquet-Melou, A. (2011). Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance outcomes in a mouse-lung model of *Pasteurella multocida* infection. *Vet Microbiol* 148, 292-297.
- Forrest, A., Nix, D.E., Ballow, C.H., Goss, T.F., Birmingham, M.C., and Schentag, J.J. (1993). Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1073-1081.
- Fulton, R.W. (2009). Bovine respiratory disease research (1983-2009). *Anim Health Res Rev* 10, 131-139.
- Hansen, K.H., Damborg, P., Andreasen, M., Nielsen, S.S., and Guardabassi, L. (2012). Carriage and fecal counts of cefotaxime M-producing *Escherichia coli* in pigs: a longitudinal study. *Appl Environ Microbiol* 79, 794-798.
- Hoyle, D.V., Knight, H.I., Shaw, D.J., Hillman, K., Pearce, M.C., Low, J.C., Gunn, G.J., and Woolhouse, M.E. (2004). Acquisition and epidemiology of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a cohort of newborn calves. *J Antimicrob Chemother* 53, 867-871.
- Ismail, M., and El-Kattan, Y.A. (2007). Comparative pharmacokinetics of marbofloxacin in healthy and *Mannheimia haemolytica* infected calves. *Res Vet Sci* 82, 398-404.
- Kastner, U., and Guggenbichler, J.P. (2001). Influence of macrolide antibiotics on promotion of resistance in the oral flora of children. *Infection* 29, 251-256.

- Kesteman, A.S., Ferran, A.A., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Sanders, P., Toutain, P.L., and Bousquet-Melou, A. (2009). Influence of inoculum size and marbofloxacin plasma exposure on the amplification of resistant subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* in a rat lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4740-4748.
- Khachatryan, A.R., Hancock, D.D., Besser, T.E., and Call, D.R. (2004). Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Appl Environ Microbiol* 70, 752-757.
- Kroemer, S., Galland, D., Guerin-Fauble, V., Giboin, H., and Woehrle-Fontaine, F. (2012). Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. *Vet Rec* 170, 53.
- Laxminarayan, R. (2014). Antibiotic effectiveness: balancing conservation against innovation. *Science* 345, 1299-1301.
- Laxminarayan, R., and Brown, G.M. (2001). Economics of Antibiotic Resistance: A Theory of Optimal Use. *Journal of Environmental Economics and Management* 42, 183-206.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., and Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13, 1057-1098.
- Mann, S., Siler, J.D., Jordan, D., and Warnick, L.D. (2011). Antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* isolates in dairy cows following systemic treatment with ceftiofur or penicillin. *Foodborne Pathog Dis* 8, 861-867.
- Mcbratney, A., Whelan, B., Ancev, T., and Bouma, J. (2005). Future Directions of Precision Agriculture. *Precision Agriculture* 6, 7-23.
- Mizunaga, S., Kamiyama, T., Fukuda, Y., Takahata, M., and Mitsuyama, J. (2005). Influence of inoculum size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in vitro activities and in vivo efficacy of fluoroquinolones and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 56, 91-96.
- Nguyen, T.T., Chachaty, E., Huy, C., Cambier, C., De Gunzburg, J., Mentre, F., and Andremont, A. (2012). Correlation between fecal concentrations of ciprofloxacin and fecal counts of resistant Enterobacteriaceae in piglets treated with ciprofloxacin: toward new means to control the spread of resistance? *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4973-4975.
- Nickell, J.S., and White, B.J. (2010). Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26, 285-301.

- Oliver, S.P., Murinda, S.E., and Jayarao, B.M. (2011). Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathog Dis* 8, 337-355.
- Pagel, S.W., and Gautier, P. (2012). Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev Sci Tech* 31, 145-188.
- Peer, D. (2014). Precision medicine--delivering the goods? *Cancer Lett* 352, 2-3.
- Pereira, R.V., Siler, J.D., Bicalho, R.C., and Warnick, L.D. (2014). In vivo selection of resistant *E. coli* after ingestion of milk with added drug residues. *PLoS One* 9, e115223.
- Rice, J.A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D.C., and Shewen, P.E. (2007). Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8, 117-128.
- Schaefer, A.L., Cook, N.J., Church, J.S., Basarab, J., Perry, B., Miller, C., and Tong, A.K. (2007). The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Res Vet Sci* 83, 376-384.
- Singh, K., Ritchey, J.W., and Confer, A.W. (2011). Mannheimia haemolytica: bacterial-host interactions in bovine pneumonia. *Vet Pathol* 48, 338-348.
- Spreng, M., Deleforge, J., Thomas, V., Boisrame, B., and Drugeon, H. (1995). Antibacterial activity of marbofloxacin. A new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *J Vet Pharmacol Ther* 18, 284-289.
- Timsit, E., Bareille, N., Seegers, H., Lehebel, A., and Assie, S. (2011). Visually undetected fever episodes in newly received beef bulls at a fattening operation: occurrence, duration, and impact on performance. *J Anim Sci* 89, 4272-4280.
- Toutain, P.L., Bousquet-Melou, A., Ferran, A.A., Pelligand, L., and Lees, P. (2015). Veterinary medicine needs new and innovative green antimicrobial drugs. *Pharmacology matters* 8, 20-21.
- Toutain, P.L., Del Castillo, J.R., and Bousquet-Melou, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci* 73, 105-114.
- Vagsholm, I., and Hojgard, S. (2010). Antimicrobial sensitivity--A natural resource to be protected by a Pigouvian tax? *Prev Vet Med* 96, 9-18.
- Vasseur, M.V., Laurentie, M., Rolland, J.G., Perrin-Guyomard, A., Henri, J., Ferran, A.A., Toutain, P.L., and Bousquet-Melou, A. (2014). Low or high doses of cefquinome targeting low or high bacterial inocula cure *Klebsiella pneumoniae* lung infections but differentially impact the levels of antibiotic resistance in fecal flora. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1744-1748.

- Wiuff, C., Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., and Aarestrup, F.M. (2003). The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs. *Res Vet Sci* 75, 185-193.
- Zaheer, R., Cook, S.R., Klima, C.L., Stanford, K., Alexander, T., Topp, E., Read, R.R., and Mcallister, T.A. (2013). Effect of subtherapeutic vs. therapeutic administration of macrolides on antimicrobial resistance in *Mannheimia haemolytica* and enterococci isolated from beef cattle. *Front Microbiol* 4, 133.
- Zecchinon, L., Fett, T., and Desmecht, D. (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res* 36, 133-156.
- Zhao, X., and Drlica, K. (2001). Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 33 Suppl 3, S147-156.

Liste des publications et communications

Communications en conférence

Conférences internationales

Novembre 2015 – International Society for Veterinary Epidemiology and Economics Conference, Cancun

Impact of a decreased antimicrobial therapy at early stage of spontaneous bovine pneumonia cases on antimicrobial consumption and therapeutic efficacy

Guillaume Lhermie, Alain Bousquet-Melou, Farid El Garch, Henri Seegers, Sébastien Assié

Octobre 2015 – European Buiatrics Forum, Rome

Impact of an alternative protocol to treat bovine respiratory disease, using decreased antimicrobial regimen on therapeutic efficacy and antimicrobial consumption.

Guillaume Lhermie, Henri Seegers, Sébastien Assié

Octobre 2015 – European Buiatrics Forum, Rome

Impact of low and high antimicrobial regimen on selection of resistant bacteria in commensal gut flora of young bulls treated for bovine respiratory disease.

Guillaume Lhermie, Aude Ferran, Farid El Garch, Frédérique Woerhlé, Henri Seegers, Sébastien Assié

Juillet 2015 – European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology congress, Nantes

Evaluation of the influence of treatment time and antibiotic dosage regimen on bacterial burden and clinical outcomes in experimentally infected calves with *Mannheimia haemolytica*.

Guillaume Lhermie, Aude Ferran, Farid El Garch, Marc Schneider, Frédérique Woerhlé, Pierre-Louis Toutain, Alain Bousquet-Melou, Gilles Meyer

Mars 2015 - International One health conference congress, Amsterdam

Assessing the impact of measures to decrease antimicrobial use in livestock production: example of the french public policies.

Guillaume Lhermie, Didier Raboisson, Stéphane Krebs, Pierre Dupraz

Septembre 2014 - Conference of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine, Berlin

Influence of *Pasteurellaceae* species and dose regimen on *in vitro* activity an *in vivo* efficacy of a fluoroquinolone treatment.

Guillaume Lhermie, Aude Ferran, Farid El Garch, Gilles Meyer, Alain Bousquet-Melou

Juillet 2014 - World Buiatrics Congress, Cairns

Impact of early versus later fluoroquinolone treatment on the clinical and microbiological outcomes in calves challenged with *Mannheimia haemolytica*

Guillaume Lhermie, Aude Ferran, Farid El Garch, Alain Bousquet-Melou , Gilles Meyer

Mai 2014 - Colloque international francophone de microbiologie animale (CIFMA),

Toulouse

Influence de la dose et de la précocité d'un traitement antibiotique avec une fluoroquinolone sur la guérison bactériologique après infection a *Mannheimia haemolytica* chez le veau.

Guillaume Lhermie, Diane Pacalin, Aude Ferran, Alain Bousquet-Melou, Gilles Meyer

Etude *In Vitro* Et *In Vivo* de l'activité de la Marbofloxacin contre *Pasteurella Multocida* et *Mannheimia Haemolytica*. Short communication

Guillaume Lhermie, Aude Ferran, Gilles Meyer, Alain Bousquet-Melou

Conférences nationales

Mai 2015 - Journées Nationales des GTV, Nantes

Influence de la dose et de la précocité d'un traitement antibiotique avec une fluoroquinolone sur la guérison bactériologique et clinique après infection à *Mannheimia haemolytica* chez le veau

Diane Pacalin, **Guillaume Lhermie**, Aude Ferran, Frédérique Woerhlé, Alain Bousquet-Melou, Gilles Meyer

Publications

Acceptée

Octobre 2015

Bacterial species-specific activity of a fluoroquinolone against two closely related Pasteurellaceae with similar MICs. Differential in vitro inoculum effects and in vivo efficacies.

Guillaume Lhermie, Farid El Garch, Pierre-Louis Toutain, Aude A. Ferran, and Alain Bousquet-Mélou
Accepted publication in Plos One

Juin 2015

Facteurs déterminants et leviers de réduction de l'usage des antibiotiques en productions animales

Guillaume Lhermie, Didier Raboisson, Stéphane Krebs, Pierre Dupraz
Accepted publication in Revue de la Société Française d'Economie Rurale

Soumises

Septembre 2015

Field evaluation of antimicrobial consumption and therapeutic efficacy of alternative treatment for bovine respiratory disease

Guillaume Lhermie, Farid El Garch, Marc Schneider, Frédérique Woerhlé, Alain Bousquet-Mélou, Gilles Meyer, Henri Seegers, Sébastien Assié
Submitted publication in Journal of Antimicrobials Chemotherapy

Septembre 2015

Impact of low and high antimicrobial regimen on selection of resistant *Enterobacteriaceae* on commensal gut flora of veal calves and young bulls treated with fluoroquinolone

Guillaume Lhermie, Farid El Garch, Véronique Dupouy, Alain Bousquet-Mélou, Henri Seegers, Sébastien Assié
Submitted publication in Zoonoses and Public Health

Août 2015

Impact of time of treatment and decreased fluoroquinolone treatment regimen on the microbiological, pathological and clinical outcomes in calves challenged with *Mannheimia haemolytica*

Guillaume Lhermie, Aude Ferran, Diane Pacalin, Farid El Garch, Marc Schneider, Frédérique Woerhlé, Maxence Delverdier, Alain Bousquet-Mélou, Hervé Cassard, Gilles Meyer
Submitted publication in Frontiers in Microbiology

Table des figures

Figure 1-1 : Les flores bactériennes critiques pour l'antibiothérapie en élevage. Enjeux de santé animale et enjeux de santé publique.	17
Figure 1-2 : Modèle conceptuel décrivant les principaux facteurs influençant les décisions individuelles de recours aux antibiotiques et les leviers de diminution.....	20
Figure 2-1 : Modèle conceptuel décrivant les principaux facteurs influençant les décisions individuelles de recours aux antibiotiques et les leviers de diminution. Source : les auteurs.	44
Figure 2-2: Représentation tridimensionnelle des effets de la maladie sur la fonction de production. Sur l'axe x sont représentés les inputs X (XI usage intensif, XE usage extensif) ; l'axe z représente l'intensité ou la contagiosité de la maladie M ; l'axe y représente les outputs Q (sans maladie Q ou avec maladie QM). Source : les auteurs.....	47
Figure 2-3: Modèle coût-bénéfice de l'utilisation d'un traitement dans une situation où existe un effet de seuil: Dans cette représentation, l'intensité de la maladie est constante. Source : d'après Tisdell, 1995.....	48
Figure 2-4: Représentation schématique du système pharmaceutique vétérinaire Source : les auteurs.	52
Figure 3-1 : Time-kill curves of low (10 ⁵ CFU/mL) (A and B) and high (10 ⁸ CFU/mL) (C and D) inocula of <i>M. haemolytica</i> (A and C) and for <i>P. multocida</i> (B and D) in the presence of marbofloxacin (concentrations shown in multiple of the MIC (MIC = 0.016 µg/mL for <i>P. multocida</i> and MIC = 0.03 µg/mL for <i>M. haemolytica</i>).	78
Figure 3-2: Bactericidal effect of marbofloxacin against low (A) and high (B) inocula of <i>M. haemolytica</i> (full symbols) and <i>P. multocida</i> (open symbols) isolates.....	79
Figure 3-3: Mean bacterial counts in the lungs of mice infected with <i>P. multocida</i> (dark bars) or with <i>M. haemolytica</i> (white bars) after intraperitoneal administrations of different doses of marbofloxacin. Different letters in superscript above bars indicate that values are statistically different.	82
Figure 4-1 : Mean titers (with standard deviations) of <i>M. haemolytica</i> DNA copies in bronchoalveolar lavages (A) and mean accumulated bacterial shed (B) in calves treated with 2 mg/kg (E2) marbofloxacin at 4 h after inclusion (E2) or 2 mg/kg (L2) or 10 mg/kg (L10)	

marbofloxacin at 36 h after inclusion. The black and red arrows indicate the time of early and late treatments respectively. Significant differences: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 99

Figure 4-2 : Mean titers of *M. haemolytica* DNA copies (with standard deviations) in respiratory post-mortem tissues of calves not treated (■), treated with 2 mg/kg marbofloxacin at 4 h after inclusion (E2, □), or 2 mg/kg (L2, ▨) or 10 mg/kg (L10, ▩) marbofloxacin at 36 h after inclusion. Significant differences are shown in the table: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 101

Figure 4-3 : Mean clinical scores (A) and mean accumulated clinical scores (B) of calves inoculated with *M. haemolytica* and treated with 2 mg/kg (E2) marbofloxacin at 4 h after inclusion (black arrow) or 2 mg/kg (L2) or 10 mg/kg (L10) marbofloxacin at 36 h after inclusion (red arrow). For (A), calves remained in the control group until the time of treatment. For (B), individual ACS were determined as the area under the curve of clinical scores collected at -16, 6, 24, 40, 72 and 96 hours (Graph Pad software, La Jolla, USA). Significant differences: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. 104

Figure 4-4 : Microscopic examination. 4A: Normal lung microscopic examination (hemalun & eosin, x200). 4B: Lesions of hemorrhagic alveolitis, large fibrinous deposits and major infiltration of leucocytes, score of 2 (hemalun & eosin, x200). 4C: oat cells and altered neutrophils, score of 2 (hemalun & eosin, x200). 4D: Macrophagic alveolitis, score of 1 (hemalun & eosin, x200). 4E: Mean histopathological score (+/- sd) of calves challenged with *M. haemolytica* and treated with 2 or 10 mg/kg marbofloxacin at the early or late stages of infection. 4F: Correlation between the total cranioventral percentage of lobe consolidation (gross lesions, x axis) and number of lobes with microscopic lesions (y-axis). 106

Figure 5-1 : Distribution of the YBs in the groups in function of the treatments administered. In herds A,B,C, systematic antimicrobial treatment was performed with Tildipirosin. In herds A, B, and C 2nd line treatment was florfenicol, in herds D, E, and F, 2nd line treatment was tulathromycin. 127

Figure 5-2: Mean proportion of 1st and 2nd line treatments in E2 and L10 groups. The proportion (expressed in percentage) of 1st line treatment is calculated as the number of YBs treated with a 1st line treatment in the group / number of YBs in the group. The proportion of 2nd line treatment is calculated as number of YBs treated with a 2nd line treatment in the group / number of YBs treated with a 1st line treatment in the group..... 128

Figure 5-3: Curative and systematic exposures of the young bulls, according to the strategy implemented in the herds (absence or presence of systematic antimicrobial treatment) and the therapeutic strategy (E2 or L10). 128

Figure 5-4: Mean antimicrobial usage (tildipirosin for systematic treatment, marbofloxacin as 1st line, tulathromycin or florfenicol as 2nd line), expressed in TI_{UDD}, according to the systematic

strategy implemented in the herds (absence or presence), and the therapeutic strategy (E2 or L10).	130
Figure 5-5: Effects of a treatment of 2 or 10 mg/kg of marbofloxacin administered with tolfenamic acid on average total clinical score (a) and rectal temperature (b).	131
Figure 6-1: log counts of total (A), 0.12 (B) and 4 µg/mL (C) marbofloxacin-resistant <i>Enterobacteriaceae</i> in fecal young bulls samples treated with 0, 2 mg/kg or 10 mg/kg of IM marbofloxacin on day 0.....	151
Figure 6-2: log counts of total (A), of 32 µg/ml nalidixic acid - resistant <i>Enterobacteriaceae</i> (B) and 2 µg/ml of ciprofloxacin resistant <i>Enterobacteriaceae</i> (C) in fecal calves samples treated with 0, 2 mg/kg or 10 mg/kg of IM marbofloxacin on day 0.....	152
Figure 6-3: Proportions of 32 µg/ml nalidixic acid - resistant <i>enterobacteriaceae</i> (A) and 2 µg/ml of ciprofloxacin resistant <i>enterobacteriaceae</i> (B) in the faeces of calves untreated or treated with 2 or 10 mg/kg marbofloxacin as a single IM injection on D0, after faeces sampling.	153

Table des tableaux

Tableau 3-1 : Marbofloxacin MIC and MBC determined in BHIB for <i>M. haemolytica</i> and <i>P. multocida</i>	77
Tableau 3-2: Pharmacodynamic parameters ^a describing the antimicrobial activity of marbofloxacin against different inoculum sizes of <i>M. haemolytica</i> (MH) and <i>P. multocida</i> (PM) in BHIB.	80
Tableau 3-3: Effect of the different marbofloxacin doses on the survival and clinical and bacteriological cure of mice infected with <i>P. multocida</i> or <i>M. haemolytica</i>	81
Tableau 5-1 : Formulae for the calculation of the proportion of treatments administered, animal exposure proportion, incidence rates (IR) of treatments and the treatment incidence (TI _{UDD}) based on used daily doses (UDD). YB at risk: young bull belonging to a group exposed to BRD.....	124
Tableau 5-2 : Characteristics of the herds, number of young bulls (YBs) per group and exposure to antimicrobials treatments.	126
Tableau 5-3: Incidence rates (IR) of 1 st and 2 nd line treatments, and amount of curative antimicrobials used expressed in TI _{UDD} according to the herd and the group of treatment. Sum of TI _{UDD} were calculated as the sum of TI _{UDD} marbo and TI _{UDD} tula-flor.	129
Tableau 6-1: Descriptive table of the number of YBs sampled from day [-10;-3] to day 40 during the first experimentation according to their treatment.	146
Tableau 6-2: Descriptive table of the number of calves sampled from day -4 to day 5 during the second experimentation according to their treatment.	147
Tableau 6-3 : Distribution of counts of decreased susceptibility <i>enterobacteriaceae</i> over time from day [-10;-3] to day 40, isolated in the faeces of 4 YBs treated and 4 congeners YBs untreated. Treatments with 2 (LOW) or 10 (HIGH) mg/kg marbofloxacin were administered on D0, after faeces sampling.	149

Table des matières

1. CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE.....	8
1.1 Antibiotiques et antibiorésistance.....	10
1.1.1 Définitions.....	10
1.1.1.1 Emergence et sélection des résistances.....	11
1.1.2 Supports génétiques des mécanismes de résistance.....	12
1.2 Impact de l'usage des antibiotiques en médecines humaine et vétérinaire et leviers de réduction d'usage13	
1.2.1 Médecine humaine.....	13
1.2.2 Médecine vétérinaire.....	15
1.2.3 Leviers de réduction de l'usage des antibiotiques en productions animales.....	18
1.3 Stratégies de réduction de l'usage des antibiotiques dans le traitement des bronchopneumonies infectieuses (BPI) bovines : état des connaissances.....	21
1.3.1 Usages des antibiotiques lors de BPI de bovins.....	21
1.3.2 Vers une réduction des usages d'antibiotiques pour réduire la consommation globale et l'impact potentiel sur les flores commensales.....	23
1.4 Positionnement du travail de recherche.....	25
1.4.1 Problématique et objectifs.....	25
1.4.2 Hypothèses de recherche et méthodologie.....	26
1.5 Références bibliographiques.....	28
2. CHAPITRE 2. FACTEURS DETERMINANTS ET LEVIERS DE REDUCTION DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES EN PRODUCTIONS ANIMALES.....	39
2.1 Résumé en français.....	40
2.2 Abstract.....	41
2.3 Introduction.....	42
2.4 Les antibiotiques : des inputs au service de la maîtrise des maladies.....	44
2.4.1 Facteurs d'apparition exogènes et endogènes des maladies.....	44
2.4.2 Impact des maladies sur le processus de production.....	46
2.4.3 Rentabilité du traitement et sensibilité aux prix.....	48

2.4.4	Autres facteurs influençant la consommation d'antibiotiques	50
2.5	Pertinence des mesures récentes visant à réduire l'usage des antibiotiques en élevage.....	54
2.5.1	Mesures ciblant la demande.....	54
2.5.1.1	Réduire la consommation d'antibiotiques en augmentant les compétences individuelles des éleveurs.....	54
2.5.1.2	Réduire la consommation d'antibiotiques en substituant d'autres facteurs de production	56
2.5.1.3	Réduire la consommation d'antibiotiques en faisant varier les prix.....	57
2.5.2	Mesures visant l'offre des antibiotiques	57
2.5.2.1	Réduire les usages en encadrant la prescription des antibiotiques.....	58
2.5.2.2	Réduire les usages en encadrant les pratiques commerciales associées aux antibiotiques.....	58
2.5.2.3	Réduire les usages en réduisant la dépendance économique des vétérinaires aux ventes d'antibiotiques.....	60
2.6	Conclusion.....	61
2.7	Références bibliographiques	63
3.	CHAPITRE 3. DIFFERENCE D'ACTIVITE IN VITRO ET IN VIVO D'UNE FLUOROQUINOLONE SUR DEUX ESPECES BACTERIENNES DE LA FAMILLE DES <i>PASTEURELLACEAE</i> DE CMI SIMILAIRES. CONSÉQUENCES SUR LES DOSES EFFICACES	68
3.1	Résumé en français.....	69
3.2	Abstract.....	71
3.3	Introduction	72
3.4	Material and methods	73
3.4.1	Bacterial strains, media, antibiotic and reagents	73
3.4.2	In vitro testing.....	73
3.4.2.1	Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC).....	73
3.4.2.2	Time kill experiments.....	74
3.4.2.3	Mean Inoculum growth	74
3.4.2.4	Modelling of mean inoculum growth	74
3.4.3	In vivo testing.....	75
3.4.3.1	Animals.....	75
3.4.3.2	Induction of neutropenia.....	76
3.4.3.3	Lung infection model.....	76
3.5	Results.....	77
3.5.1	In vitro testing.....	77

3.5.1.1	MIC and MBC results.....	77
3.5.1.2	Time-kill curves.....	78
3.5.2	Pharmacodynamic modelling	79
3.5.3	Infection model.....	81
3.5.3.1	Clinical outcomes: mouse survival.....	81
3.5.3.2	Microbiological outcomes: pulmonary bacterial loads.....	82
3.6	Discussion	83
3.7	References	87
4.	CHAPITRE 4. IMPACT DE LA DOSE ET DE LA PRECOCITE D'UN TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE AVEC UNE FLUOROQUINOLONE SUR LES GUERISONS BACTERIOLOGIQUE ET CLINIQUE ET L'EXTENSION DES LESIONS PULMONAIRES APRES INFECTION EXPERIMENTALE A MANNHEIMIA HAEMOLYTICA CHEZ LE VEAU	89
4.1	Résumé en français.....	90
4.2	Abstract.....	92
4.3	Introduction	93
4.4	Materials and methods.....	94
4.4.1	Bacteria and culture.....	94
4.4.2	Experimental infection of calves with <i>M. haemolytica</i>	95
4.4.3	Clinical examination and respiratory sampling.....	96
4.4.4	Necropsy and tissue sampling	97
4.4.5	<i>M. haemolytica</i> quantification.....	98
4.4.6	Statistical analysis	99
4.5	Results.....	99
4.5.1	Kinetics of <i>M. haemolytica</i> loads in bronchoalveolar lavages.....	99
4.5.2	Comparisons of <i>M. haemolytica</i> DNA loads in all included calves at T3 of euthanasia	100
4.5.3	Clinical responses of calves to <i>M. haemolytica</i> infection	103
4.5.4	Lung lesions.....	104
4.6	Discussion	107
4.7	References	111
5.	CHAPITRE 5. NOUVELLES PERSPECTIVES DE TRAITEMENT DES MALADIES RESPIRATOIRES BOVINES : EVALUATION TERRAIN DE LA CONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES ET DE L'EFFICACITE THERAPEUTIQUE D'UN PROTOCOLE DE TRAITEMENT AJUSTE	115
5.1	Résumé en français.....	116
5.2	Abstract.....	118

5.3	Introduction	119
5.4	Material and methods	120
5.4.1	Study design.....	120
5.4.2	Detection of illness	121
5.4.3	Clinical follow up.....	122
5.4.4	Antimicrobial treatments.....	122
5.4.4.1	Systematic antimicrobial treatments.....	122
5.4.4.2	1st line treatments.....	122
5.4.4.3	2nd line and 3rd line treatments	123
5.4.5	Exposure to antimicrobials and drug consumption.....	123
5.4.5.1	Data collection.....	123
5.4.5.2	Processing of antimicrobial exposure evaluation	123
5.4.5.3	Processing of antimicrobial consumption evaluation	123
5.4.6	Statistical analysis	125
5.5	Results.....	125
5.5.1	Exposure to antimicrobials	125
5.5.2	Antimicrobial consumption	129
5.5.3	Clinical scores.....	130
5.5.4	Therapeutic efficacy.....	131
5.6	Discussion	131
5.7	References	135
6.	CHAPITRE 6. EVALUATION DE L'IMPACT DE DEUX DOSES DE FLUOROQUINOLONE SUR LA SELECTION DE BACTERIES RESISTANTES DANS LA FLORE INTESTINALE COMMENSALE DU VEAU ET DU JEUNE BOVIN.....	140
6.1	Résumé en français.....	141
6.2	Abstract.....	143
6.3	Introduction	144
6.4	Material and methods	145
6.4.1	Experiment on young bulls (YB).....	145
6.4.1.1	Animals and antimicrobial treatments.....	145
6.4.1.2	Faecal sampling and bacteriology	146
6.4.2	Experiment on veal calves (VC).....	146
6.4.2.1	Animals and antimicrobial treatments.....	146
6.4.2.2	Faecal sampling and bacteriology	147
6.4.3	Statistical analysis	147
6.5	RESULTS	148

6.5.1	Experiment YB.....	148
6.5.1.1	Bacterial counts	148
6.5.1.2	Numbers of animals harboring resistant strains before and after treatment	148
6.5.2	Experiment VC	149
6.5.2.1	Bacterial counts and proportion of resistant bacteria.....	149
6.5.2.2	Numbers of animals harboring resistant strains before and after treatment	150
6.6	Discussion	154
6.7	References	157
7.	CHAPITRE 7. DISCUSSION GENERALE.....	161
7.1	Rappel des objectifs.....	162
7.2	Principaux résultats.....	163
7.2.1	Preuve expérimentale de la possibilité de réduction de dose antibiotique nécessaire la guérison d'infections respiratoires dues à des <i>Pasteurellaceae</i>	163
7.2.1.1	Réduction de la dose efficace en fonction du pathogène ciblé	163
7.2.1.2	Réduction de la dose efficace en fonction de la taille de l'inoculum et de la précocité du traitement.....	164
	• Evaluation in vitro.....	164
	• Évaluation in vivo.....	165
7.2.2	Preuve de l'intérêt d'un protocole thérapeutique associant détection précoce et dose antibiotique diminuée dans le traitement des BPI spontanées pour réduire la consommation d'antibiotique à l'échelle d'un lot.....	166
7.2.3	Impact de la marbofloxacin sur les entérobactéries chez le veau et le jeune bovin.....	167
7.3	Limites et perspectives de recherche	167
7.3.1	Impact d'une dose diminuée sur la sélection de bactéries résistantes aux FQ.....	167
7.3.2	Facteurs influençant l'efficacité du protocole antibiotique à dose réduite	169
7.3.3	Réduction des quantités d'antibiotiques utilisées pour le traitement des BPI	171
7.3.3.1	Réduction de l'antibiothérapie systématique.....	171
7.3.3.2	Réduire les doses d'autres familles d'antibiotiques.....	171
7.3.3.3	Réduire les doses de marbofloxacin dans le traitement des maladies respiratoires bovines	172
7.4	Implications en antibiothérapie vétérinaire	173
7.4.1	Les enjeux de la médecine vétérinaire de précision : réduire le nombre d'animaux exposés inutilement aux antibiotiques ou surexposés	173
7.4.2	Rôle des pouvoirs publics dans le soutien à l'innovation en antibiothérapie vétérinaire.....	174
7.5	Références	177
	Liste des publications et communications.....	183

Table des figures.....	186
Table des tableaux.....	189
Table des matières.....	190

Thèse de Doctorat

Guillaume LHERMIE

Traitement précoce des bronchopneumonies infectieuses bovines avec une dose réduite de marbofloxacine

Early treatment of bovine respiratory disease with a decreased marbofloxacin regimen

Résumé

L'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire peut conduire à la sélection de bactéries résistantes, potentiellement transmissibles à l'homme. Notre étude consistait à évaluer en conditions de terrain l'efficacité d'un traitement précoce des bronchopneumonies infectieuses (BPI) bovines avec une dose réduite de marbofloxacine, ainsi que ses impacts sur la quantité d'antibiotiques consommée et sur la sélection de bactéries résistantes de la flore commensale digestive. Des approches contrôlées, *in vitro* et sur modèle animal (souris et veau), ont permis de valider l'efficacité d'une dose réduite et de déterminer ses conditions d'utilisation. Pendant l'étude de terrain, les bovins étaient équipés de dispositifs permettant de suivre l'évolution de leur température ruminale, dont l'augmentation peut signer le début d'un épisode infectieux. Par rapport à la dose de 10 mg/kg recommandée par le fabricant, un unique traitement précoce avec 2 mg/kg de marbofloxacine, avant l'apparition des signes cliniques, permet de réduire la consommation globale d'antibiotique à l'échelle du lot d'animaux, malgré l'augmentation du nombre de traitements administrés. Quelle que soit la dose, l'impact de la marbofloxacine sur la sélection de bactéries commensales s'est révélé limité chez le veau et le jeune bovin. *In fine*, nos travaux mettent en évidence à travers le cas des BPI, la possible réduction de l'usage des antibiotiques en médecine bovine. Pour ce faire, le développement d'une médecine vétérinaire de précision, associant outils de monitoring et de diagnostic avec des protocoles médicamenteux ajustés, devra être encouragé.

Mots clés

Bovin, bronchopneumonie infectieuse, fluoroquinolone, traitement précoce, dose réduite, antibiorésistance, médecine de précision

Abstract

The use of antibiotics in veterinary medicine may lead to selection of resistant bacteria, potentially transmissible to humans. Our study aimed at assessing under field conditions the effectiveness of early treatment of bovine respiratory disease (BRD) with a reduced dose of marbofloxacin, and its impact on (i) the amount of antibiotics consumed, and (ii) the selection of resistant commensal bacteria in the digestive tract. Preliminary experimental studies (*in vitro* and in animal models - mice and calf) allowed to validate the effectiveness of a reduced dose and to determine its conditions of use. During the field study, cattle were monitored using devices measuring their ruminal temperature, which increase constitutes an early sign of disease. In comparison with the administration of the 10 mg/kg dose recommended by the manufacturer, a unique early treatment with 2 mg/kg marbofloxacin, before the onset of clinical signs, did reduce overall antibiotic consumption at the batch or farm level, despite an increase in the number of administered treatments. Whatever the dose, the impact of marbofloxacin on selecting commensal bacteria proved limited in calves and young cattle. Finally, our work highlights through the case of BRD, the possible reduction of the use of antibiotics in bovine medicine. To achieve this, the development of a veterinary precision medicine, combining monitoring and diagnosis tools with adjusted medication protocols, should be encouraged.

Key Words

Cattle, bovine respiratory disease, fluoroquinolone, early treatment, decreased regimen, antimicrobial resistance, precision medicine