



HAL
open science

Contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques : évaluation du transfert vers les denrées d'origine animale et risque de sélection d'antibiorésistance

Cristina Santos-Santorum Suarez

► To cite this version:

Cristina Santos-Santorum Suarez. Contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques : évaluation du transfert vers les denrées d'origine animale et risque de sélection d'antibiorésistance. Santé publique et épidémiologie. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB056 . tel-04506625

HAL Id: tel-04506625

<https://theses.hal.science/tel-04506625>

Submitted on 15 Mar 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637
Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Santé publique

Par

Cristina SANTOS-SANTORUM SUAREZ

Contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques : évaluation du transfert vers les denrées d'origine animale et risque de sélection d'antibiorésistance

Thèse présentée et soutenue à Fougères, le 28 novembre 2023

Unité de recherche : Anses- Laboratoire de Fougères

Rapporteurs avant soutenance :

Ludovic PELLIGAND
Gaud DERVILLY-PINEL

Professeur – The Royal Veterinary College
Directrice adjointe – Laberca

Composition du Jury :

Président :
Yves MILLEMANN

Professeur – Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Dir. de thèse :
Pascal SANDERS

Directeur de recherche – Anses

Encadrants :
Murielle GAUGAIN
Agnès PERRIN-GUYOMARD

Chargée de projet de recherches – Anses
Chargée de projet scientifique et technique – Anses

Remerciements

Cette thèse a été pour moi une merveilleuse expérience qui m'a permis rencontrer des personnes formidables tout au long du chemin. Je tenais à remercier tout le monde qui a été présent pour moi pendant ces trois ans. Je préviens, cette partie va être un peu longue et il y aura des changements de langue, mais je ne veux oublier personne !

Je remercie tout d'abord les membres de mon **jury de thèse**, Ludovic Pelligand, Gaud Dervilly-Pinel et Yves Milleman qui m'ont fait l'honneur d'évaluer et juger mes travaux de thèse. Merci également aux **membres de mon CSI** Damien Bouchard, Gwendoline Hervé et Philippe Fravallo pour leurs conseils lors des deux comités organisés.

Je remercie mon directeur de thèse, **Pascal**, pour m'avoir accepté en tant que doctorante et m'avoir permis de mener ces travaux de thèse. Merci pour le suivi et pour tous les conseils pour le bon déroulement de ma thèse. Merci pour le calme et l'écoute à chaque fois qu'on échangeait.

Tahar, merci pour ton investissement pour le bon fonctionnement et dynamique du labo, mais également pour tous les conseils par rapport à la course à pied ! C'est toujours un plaisir de parler avec toi.

Je remercie mes deux encadrantes (ou presque mes deux mamans au labo !), très différentes mais très complémentaires. **Murielle**, merci pour m'avoir tout appris sur la partie analytique, pour ta patience et ton implication dans les explications pour que tout soit clair, merci également pour la partie métabolomique, qui n'était pas évident pour quelqu'un qui ne s'y connaît pas ! **Agnès**, merci pour ta patience avec les corrections de l'article microbio (j'ai eu du mal mais finalement c'est réussi !) ; je te remercie aussi d'avoir géré la demande AMI ainsi que tout le côté qPCR et séquençage. Merci à toutes les deux de m'avoir permis d'apprendre autant de domaines (et bien évidemment, merci pour votre aide pendant les phases animales !). Je vous remercie également pour toutes les conversations autres que la thèse qu'on a eu et pour la gentillesse que vous aviez toujours portée envers moi.

Merci à tous ceux qui ont participé dans ce projet :

- **Michel**, merci pour tes explications en statistiques et sur le profil d'exactitude, mais surtout pour nos discussions sur l'Espagne, le sud de la France, les plats typiques...et pour m'avoir emmené à la pêche avec toi !
- **Alexis**, je te remercierai jamais assez, sans toi nous n'aurions jamais pu faire ce projet. Merci pour ton aide et soutien avec les opérations, la planification des phases animales et les prélèvements. Merci aussi pour le côté PK/modélisation (heureusement que tu es là !) et pour ton aide avec la rédaction des articles. Mais...il faut quand même charger un peu plus au Pump !

- **Jean-François**, toujours prêt à faire une blague ! Merci pour toutes les heures (week-ends et nuits inclus) passées à l'animalerie ! j'apprécie énormément toutes les discussions et échanges qu'on a pu avoir autour de tes séjours partout dans le monde ou de la Médocaine, entre autres. Je saurai qui appeler quand je devrai organiser mes 30 ans.
- **Charlotte**, merci infiniment pour ton aide pendant les phases animales mais aussi pour toutes les manips microbio (et pour ta patience et ton sourire quand je faisais une boulette !). Félicitations encore pour le petit Arthur ! **Paméla**, merci également pour les manips en microbio et pour le traitement des données sur Galaxy ! Vous êtes le binôme parfait !
- **Marie-Pierre Lagrée**, pour ton aide avec les dosages, avec les pesées des premix, l'héparinage de tubes, le découpage et broyage des tissus (sans toi je n'aurais jamais réussi à finir toutes mes manips), mais également et pour toutes nos conversations pendant les heures de manips et les pauses 😊
- **Jérôme H**, pour ton aide avec toutes les expés animales, pour les opés et pour tes petites chansons pendant les heures de cinétique (tu chantes très bien même si les gens disent le contraire!).
- **Antoine**, pour ton aide avec les statistiques de toute la partie microbio, mais aussi pour tous tes conseils et échanges qu'on a eu pendant les pauses café (et merci aussi pour gérer le stock de café, absolument essentiel pour moi !).

Je tiens à remercier également **Jérôme B**, pour les dosages des prémélanges ; **Frederic Paboef** et l'Anses de Ploufragan-Plouzané pour nous avoir fourni les porcs EOPS pour l'expérimentation animale ; et **Sabine** et son équipe pour les qPCR. Merci aux unités **ARC**, **AB2R** et **EMAD** et leurs chefs **Dominique**, **Christophe** et **Michel**, pour avoir rendu possible la transversalité de cette thèse. Merci également à **Alyssia** et **Lucie**, pour la gestion des missions et congrès, pas toujours facile ! A **Frédéric M** pour ton aide et tes essais pour que je puisse enfin télétravailler ! A **Alain** pour ton efficacité pour gérer le stock. A **Nathalie** pour l'organisation des cafés scientifiques et pour toujours répondre à mes questions sur les droits d'utilisation des images, pas toujours facile. A **Hélène**, pour les étiquettes pour les phases animales, même quand c'était au dernier moment. A **Yohan**, pour ton aide à chaque fois que j'ai eu un souci informatique mais aussi pour ta gentillesse. A **Emmanuelle**, pour ton aide avec la partie intégrité scientifique et références bibliographiques.

Merci à tous ceux qui ont fait de mon séjour à l'Anses une superbe expérience. A **Zeineb**, je suis tellement heureuse de t'avoir rencontré dès mon premier jour au labo, tu es devenue une vraie amie, merci à toi et ta famille pour l'accueil en Tunisie, tu me manques ! A **Darryl**, « mon meilleur pote du labo » comme on aime le dire, merci pour tous les mardis de Koh-Lanta, les soirées chez toi, les rires autour de tes super capacités culinaires et surtout merci pour mon nouveau collègue de bureau Jean-Claude. A **Raphaël**, pour tous nos débats sur le foot, pour les lundis de formation à Nantes et pour tous les moments partagés. A **Marine**, ma superbe

collègue de bureau et mon binôme de biking, merci pour toujours être à l'écoute avec un sourire et savoir toujours quoi dire, je suis sûre que tu vas aller loin, une vraie bosseuse ! A **Annaëlle**, pour tous les moments passés à parler de tout et n'importe quoi pendant les pauses café et les repas du midi. A **Pierre**, toujours calme et ouvert à répondre à toutes mes questions sur l'informatique (et pas que !). Merci à **Béatrice, Sophie, Karine, Marie-Pierre C, Maïwenn, Youssef, Lucille, Ilhem** et **Mariam** pour tous les midis qu'on a partagé à la cantine, je garde que des bons souvenirs de toutes nos conversations et de nos promenades post-repas. A **Ghinwa**, pour avoir partagé avec moi le stress de la dernière année. Merci à **Estelle** pour répondre à mes mille questions sur la thèse, pour tous tes conseils pendant ces trois ans, merci également pour m'avoir prêté tes cours de master ! Je remercie **Gaël** pour m'avoir autant aidé avec le Vantage quand je commençais la thèse, quelle patience t'as eu !

A tous les gens avec qui j'ai partagé des moments au labo (surtout à la pause-café) : **Mélaine** et **Sophie**, toujours en train de rigoler, c'est grâce à vous que maintenant j'écoute « Sous le vent » au moins une fois par semaine ; **Anne-Louise**, pour l'intérêt que tu portes envers tout le monde, bon courage pour ta maison ! A **Rachelle, Pierre** et **Ludo** pour toujours me faire rire avec vos blagues ; à **Céline, Régine** et au trio inséparable **Marie-Pierre, Patricia** et **Sylvie**, toujours bienveillantes ; **Kahina** et **Khaled** merci pour les conseils sur la rédaction de la thèse. Merci à **Yvette** pour le sourire éternel et pour toujours être là pour répondre à mes questions sur l'athlé ! Merci à la team pump, **Thibaut, Alexis, Raphaël, Annaëlle, Marine, Mickaël, Mickaëlle, Sophie, Mireille, Estelle** et **Charlotte**, pour tous les jeudis midi où on a voulu souffrir ensemble. Je n'oublie pas mes anciennes collègues de bureau **Nelly, Audrey** et **Julia** ! J'espère que je n'oublie personne mais je remercie toutes les personnes de l'Anses pour la superbe ambiance de travail, c'est un bonheur de venir tous les matins !

A mis amigos de Santiago: **Nacho, Andre, Lau, Sori, Noe, Giovi, Antia** y **Carlita**, gracias por todos estos años de amistad, por apoyarme en la distancia y por ser mi segunda familia. Porque, aunque no nos vemos todo lo que me gustaría, cada vez que vuelvo nada cambia y es como si el tiempo nunca hubiese pasado. No sé qué haría sin vosotros.

A **Rubén**, gracias por responder a mis 100000 preguntas sobre la tesis, por tus consejos y por los cafés cada vez que voy a Santiago. A mis farmas, **Alba, María, Xandra** y **Nora**, por vuestra amistad desde el primer día que entramos en la Universidad, los 5 años de Farmacia no habrían sido lo mismo sin vosotras.

A mes amis du Mans :

- A la coronacoloc : **Manue, Manue2, Jo, Anis, Aurélie, Clarisse, Coco** et **Gaël**, pour les fous rires, les soirées, les week-ends, les sorties, le confinement ensemble, les parties de fléchettes, l'accrobranche, la parade du 24h, les vendredis à l'Eléphant qui finissent à la Loge...tellement de moments vécus ensemble ! Merci de toujours être là, de m'accueillir chez vous au moins une fois par mois et surtout merci de me faire pleurer de rire et de toujours me faire passer des super moments ! Vous êtes comme une famille pour moi.

- A la team Pelouse : **Pierre, Eva, Amélie** et **Baptiste**. Pour tous nos week-ends ensemble à faire plein d'activités (même si des fois tout ne se passe comme prévu...). Je suis tellement heureuse d'être tombée sur « Ma Coloc Sympa » qui m'a permis de vous rencontrer lors de mon premier séjour au Mans, c'est un peu grâce à vous aussi que je suis revenue en France !
- A ma chère coloc **Charlène**, aussi folle que moi, je n'aurais jamais pu trouver une meilleure coloc !
- A **Flo, Katya, Pierre, Chiara** et **Mazigh** toujours motivés à bouger et faire des choses, super rencontres de mon séjour au Mans.

A mes amis mayennais **Lucie, Maxence, Clémence, Julien, Morgane, Anthony, Anaïs, Arthur, Amandine, Nathan, Alexis, Vincent, Charlotte** et **Alex** pour m'avoir accueilli depuis mon arrivée en France, toujours bienveillants avec moi, vous êtes devenus des vrais amis !

Une petite pensée pour mes copains du club, pour les bons moments passés à l'athlé, pour les dîners à organiser des courses et pour le super week-end dans les Alpes !

Alla mia famiglia parmigiana :

- **Edu, Emi, Bei, Enric, Laura, Ale, Naza, Andrés, Nestor, Angel, Pedro** y **Dani**, por todos estos años de amistad y por el viaje obligatorio de cada verano, ¡al final nos vamos a querer y todo! Qué bonito ver lo que puede unir un Erasmus y cómo trae consigo a personas tan importantes (#OnceErasmusAlwaysErasmus).
- A **Mira, Gaëtan, Val** et **Valsace** (je ne peux pas vous appeler par le nom du groupe), pour tous les moments vécus ensemble en Italie, en France ou en Espagne, parce que le temps passe et notre belle amitié reste, comme Mira dit : on n'est pas amis, nous c'est la famille.
- **Alex, Moni** y **Alba**, la squadra vincitrice, por todas nuestras terapias de psicología y conversaciones sobre la vida, siempre dispuestos a ayudar y a apoyar en la distancia.

To my friends from Bath:

- **Kieran**, my very first (and best) friend in Bath, thank you for all the unforgettable moments in 5W and in the Walcot House, if I'm today doing a PhD is partly because of you. Miss you, sweet potato boy!
- Ai miei italiani preferiti, **Ste, Mario** e **Michele**, grazie per farmi avere male alla pancia di ridere ogni volta che ci vediamo, grazie (a voi e a tutti i napoletani di Bath) per tutti i pranzi domenicali vissuti insieme durante il mio soggiorno a Bath, ma soprattutto grazie per mostrarmi che si può essere PhD e fare tanta festa! Vi ringrazio anche per essere la dimostrazione che l'amicizia non viene definita dai km che si separano.
- Gracias a Zipi y Zape (**María** y **Anastasia**) por haber hecho aún más bonita mi experiencia en Bath y por seguir todavía presentes a día de hoy (¡y dispuestas a organizar findes de reencuentro!).

A mis padres, **Carlos** y **Mónica** por apoyarme incondicionalmente, soy lo que soy y he llegado hasta aquí gracias a vosotros. Gracias por estar siempre presentes desde la distancia y por todo lo que habéis hecho y hacéis siempre por mí. A mis hermanos **Ignacio** y **Pablo**, por lo parecidos y diferentes que somos los tres, porque tenemos el mismo humor y por lo que nos reímos y lo bien que nos lo pasamos cuando estamos juntos, ¡se nota que somos hermanos! A **Sonia**, que me ha visto crecer y lleva a nuestro lado 24 años, creo que puedo hablar por los tres hermanos al decir que somos muy afortunados de haber podido pasar nuestra infancia junto a ti y, sobre todo, de poder seguir contando contigo en nuestras vidas a día de hoy, para todos nosotros eres familia. A **Irati** y a **Cris**, que ya sois parte de la familia, gracias por todos los momentos vividos en Santiago, el Puerto, Madrid o Donosti, mis hermanos tienen mucha suerte de haberos encontrado. Mención especial a nuestra enana, **Laia**, que además de llegar a este mundo pisando fuerte contagiándonos a todos el Covid, ha llenado nuestras vidas de felicidad. Simplemente gracias a toda mi familia (tíos, abuelos, primos, etc.) por ser mi mayor apoyo y por confiar en mí.

Coco, pour être mon compagnon de vie et pour me complémenter autant. Merci pour ta patience, pour tes petites attentions, pour partager les mêmes passions et façons de vivre la vie et, surtout, merci pour toujours être prêt à me suivre dans tous les nombreux plans que j'organise. Je n'aurais pas pu trouver mieux ! Je profite également pour remercier ma **belle-famille**, qui m'a accueilli et fait sentir comme chez moi depuis le premier jour.

A mes « enfants », **Candice**, mon lapin, pour être un petit doudou, même si tu ne nous regardes pas trop on sait que tu nous aimes ; et **Oscar**, mon chaton d'amour, un petit pot de colle qui montre bien que ce n'est pas vrai que les chats sont indépendants ! Et bien sûr à notre petit lapin hyperactif **Bernard** qu'on a perdu il y a deux ans.

Table des matières

Liste des figures	11
Liste des tableaux	15
Liste des publications	17
Liste des abréviations	19
Introduction générale	23
PARTIE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE, OBJECTIFS ET METHODOLOGIE	25
I- Etat de l'art	27
1. Elevage porcin et traitements antibiotiques	27
1.1. Elevage porcin	27
1.1.1. Représentation dans le monde et en France	27
1.1.2. Aliments pour porcs	29
1.2. Les antibiotiques en médecine vétérinaire	30
1.2.1. Les antibiotiques	31
1.2.2. Utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire et en élevage porcin	32
1.2.3. Réglementation et surveillance	36
2. Aliments médicamenteux et contamination croisée	43
2.1. Les prémélanges et les aliments médicamenteux	43
2.2. La fabrication des aliments médicamenteux et la problématique de la contamination croisée	45
3. Risques chimiques liés à la contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques	49
3.1. Présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale et dépassement des LMR	49
3.2. Propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des antibiotiques cibles	50
A. Amoxicilline	50
B. Oxytétracycline	51
C. Sulfadiméthoxine	51
D. Triméthoprim	52
4. Risques biologiques liés à la contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques : l'antibiorésistance	54
4.1. Antibiorésistance : définition et situation actuelle	54
4.2. Types et mécanismes d'antibiorésistance	56
4.3. Mesures d'action pour lutter contre l'antibiorésistance	58
4.3.1. Plans d'action	58
4.3.2. Catégorisation des antibiotiques	60

4.4. Antibiorésistance et contamination croisée des aliments pour animaux	63
4.4.1. Sélection de l'antibiorésistance par des faibles concentrations d'antibiotiques	63
4.4.2. Rapport de l'EFSA	65
II- Objectifs de la thèse et stratégie de recherche	69
III- Méthodes mises en œuvre	73
1. Outils pour mesurer les risques chimiques liés aux résidus d'antibiotiques dans les aliments pour animaux	73
1.1. Analyse pharmacocinétique	73
1.1.1. Analyse non compartimentale	74
1.1.2. Analyse compartimentale	74
1.2. Méthodes analytiques de dosage des résidus d'antibiotiques et des métabolites dans les matrices biologiques	76
1.2.1. Techniques de préparation des échantillons	76
1.2.2. Technique de séparation d'analytes : la chromatographie liquide	77
1.2.3. Technique de détection pour le dosage d'antibiotiques : la spectrométrie de masse en tandem	78
1.3. Validation des méthodes de dosage des antibiotiques	82
1.4. Recherche de métabolites par spectrométrie de masse à haute résolution : analyses ciblée et non ciblée	86
1.4.1. Analyse ciblée	87
1.4.2. Analyse non ciblée (approche « métabolomique »)	88
2. Outils pour mesurer les risques biologiques liés aux résidus d'antibiotiques dans les aliments pour animaux	93
2.1. Evolution des populations bactériennes	93
2.1.1. Techniques phénotypiques	93
2.1.2. Techniques moléculaires	94
2.2. Sensibilité aux antibiotiques	95
2.2.1. Techniques phénotypiques	95
2.2.2. Techniques moléculaires	95
<u>PARTIE II : RESULTATS</u>	<u>97</u>
I- Développement et validation de la méthode analytique	99
II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale	111
1. Etude avec l'association sulfadiméthoxine/triméthoprime	111
2. Etude sur l'oxytétracycline	147
III- Etude du risque de sélection d'antibiorésistance	151
<u>PARTIE III : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION</u>	<u>161</u>

I- Discussion et perspectives	163
II- Conclusion générale	168
<u>Références</u>	<u>171</u>
<u>Annexe</u>	<u>187</u>

Liste des figures

Figure 1. A) Consommation mondiale de viande entre 1991 et 2021 en kg équivalent carcasse par habitant. (Source : OCDE). B) Consommation française de viande entre 1999 et 2021 en kg équivalent carcasse par habitant (source : Agreste).....	27
Figure 2. A) Evolution du cheptel mondial porcin entre 1961 et 2021. B) Evolution du cheptel mondial porcin par pays entre 1961 et 2021. C) Evolution du cheptel dans l'Union Européenne entre 1961 et 2021 (source : FAOSTAT)	28
Figure 3. Cheptel porcin français par région en 2021 (source : Eurostat)	28
Figure 4. A) Production d'aliments composés pour animaux par espèce entre 1989 et 2021 dans l'Union Européenne. B) Production d'aliments composés pour animaux par espèce entre 1989 et 2021 en France (source : FEFAC).....	30
Figure 5. Principaux modes d'action des antibiotiques [24]	32
Figure 6. Evolution de l'ALEA par espèce animale entre 1999 et 2021 (source : ANMV [26])	33
Figure 7. Evolution de la vente totale d'antibiotiques (toutes espèces confondues) en tonnes de substance active en France entre 2011 et 2021 (source : ESVAC).....	33
Figure 8. Exposition des porcs (ALEA) par famille d'antibiotiques en France en 2021 (source : ANMV [26]).....	34
Figure 9. Répartition de la vente d'antibiotiques pour animaux producteurs de denrées alimentaires par forme pharmaceutique en 31 pays européens en 2021 (source : ESVAC)...	36
Figure 10. Répartition de la vente d'antibiotiques (toutes les espèces confondues) par forme pharmaceutique en France (source : ANMV [26])	36
Figure 11. Procédure de calcul des LMR	38
Figure 12. Modes de transmission de la résistance à travers la chaîne alimentaire [41].....	40
Figure 13. Répartition du poids vif traité via les aliments médicamenteux par espèce [48] ..	43
Figure 14. Evolution de l'exposition des porcs aux différentes formes pharmaceutiques entre 1999 et 2021 en France [26]	44
Figure 15. Exposition des porcs (ALEA) aux aliments médicamenteux par région en 2020 [48]	45
Figure 16. Taux de contamination retrouvé par antibiotique dans les aliments pour porc en 2018 (en rouge) comparé au tonnage vendu sous forme de prémélange (en vert) [60].....	48
Figure 17. Structure de l'amoxicilline.....	51

Figure 18. Structure de l'oxytétracycline	51
Figure 19. Structure de la sulfadiméthoxine	52
Figure 20. Structure du triméthoprim.....	52
Figure 21. Pourcentage de résistance des E. coli indicatrices chez le porc en 2019 (A) et 2021 (B) (d'après [67, 81]).....	55
Figure 22. Evolution de la sensibilité aux 3 antibiotiques pour E. coli, toutes pathologies [82]	56
Figure 23. Mécanismes de transfert de gènes de résistance [86]	57
Figure 24. Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (d'après [25]).....	58
Figure 25. Concept « One health ».....	59
Figure 26. Catégories d'antibiotiques selon la catégorisation de l'EMA [99]	62
Figure 27. Représentation de la croissance bactérienne des populations sensible et résistante en fonction de la concentration d'antibiotique [100].....	64
Figure 28. Représentation du calcul de la FARSC (d'après [108]).....	67
Figure 29. Problématique de recherche du projet. Encerclés en jaune et en vert, deux dangers conduisant à deux risques*	69
Figure 30. Représentation d'un modèle monocompartimental (A), bicompartimental (B) et monocompartimental avec administration extravasculaire (C)	75
Figure 31. Principe et étapes de la SPE : conditionnement de la cartouche, dépose de l'échantillon, lavage pour éliminer les interférents et élution des analytes d'intérêt [111]... ..	77
Figure 32. Types de techniques et de sources d'ionisation en fonction de la polarité et la taille des analytes (d'après [128-130]).....	80
Figure 33. Représentation de la source electrospray [131].....	80
Figure 34. Représentation d'un triple quadripôle.....	81
Figure 35. Approche caractéristique par caractéristique (A) et approche globale (B) pour la caractérisation d'une méthode analytique [133]	84
Figure 36. Fidélité, justesse et exactitude.....	85
Figure 37. Représentation d'un profil d'exactitude	86
Figure 38. Représentation d'un ToF [138].....	87
Figure 39. Score plot d'une analyse multivariée	91
Figure 40. Représentation des tests de permutations. Les valeurs de $R2Y_{perm}$ et $Q2Y_{perm}$ doivent tomber en dessous de $R2Y$ et $Q2Y$ respectivement pour que le modèle soit acceptable.....	92

Figure 41. Méthode analytique pour le dosage des antibiotiques (amoxicilline, oxytétracycline, sulfadiméthoxine et triméthoprim) dans les différentes matrices de porc (plasma, muscle, foie, rein et fèces)*	99
Figure 42. Synthèse de l'étude animale réalisée avec l'association sulfadiméthoxine/triméthoprim*	112
Figure 43. Données plasmatiques de l'oxytétracycline. La ligne rouge représente la LLOQ de la méthode	148
Figure 44. Résumé de l'étude animale réalisée sur l'étude de la sélection de résistance* ..	151

**Une partie de ces figures a été créée en utilisant Servier Medical Art. Servier Medical Art de Servier est sous licence Creative Commons Attribution 3.0*

Liste des tableaux

Tableau 1. Antibiotiques utilisés chez le porc.....	35
Tableau 2. Résumé des règlements européens concernant les aliments pour animaux, les médicaments vétérinaires, les LMR et leur respect, les aliments médicamenteux et la surveillance de la résistance aux antibiotiques	42
Tableau 3. Paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de l'amoxicilline, l'oxytétracycline, la sulfadiméthoxine et le triméthoprim.....	53
Tableau 4. Substances actives pour lesquelles l'EFSA a évalué les concentrations maximales de contamination croisée qui n'entraîneraient pas de sélection ou émergence de résistance...	66
Tableau 5. Estimations des concentrations d'antimicrobiens dans l'aliment qui n'entraîneraient pas de sélection ni d'émergence de résistance [108]	68
Tableau 6. Caractéristiques d'une méthode analytique (d'après [133])	83
Tableau 7. Résultats des dosages tissulaires.....	149

Liste des publications

Publications dans des revues scientifiques à comité de lecture :

- Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., Hurtaud-Pessel, D., Laurentie, M., Viel, A., Taillandier, J-F., Lagrée, M-P. & Gaugain, M. (2022): Validation of a LC-MS/MS method for the quantitative analysis of four antibiotics in pig tissues and plasma to assess the risk of transfer of residues to edible matrices after exposure to cross-contaminated feed. Food Additives & Contaminants: Part A.
- Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Gaugain, M., Viel, A., Paboeuf, F., Taillandier, J-F., Houée, P., Valentin, C. & Perrin-Guyomard, A. (2023): Selection of antibiotic resistance in pigs after exposure to feed cross-contaminated with oxytetracycline. Veterinary Microbiology.
- Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Taillandier, J-F., Lagrée, M-P., Viel, A. & Gaugain, M.: Assessment of the risk of antimicrobial residues in edible pig tissues after exposure to cross-contaminated feed: a case study with sulphadimethoxine/trimethoprim. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Soumis Août 2023.

Communications en congrès internationaux :

- Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Viel, A., Henri, J., Taillandier, J-F., Lagrée, M-P. & Gaugain, M.: Antibiotic cross-contamination of feedingstuffs: assessment of transfer to food of animal origin. Poster présenté au Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine-Madrid (Espagne). 11-14 Septembre.
- Santos-Santórum Suárez, C., Gaugain, M., Perrin-Guyomard, A. & Sanders, P.: Antibiotic cross-contamination of feedingstuffs: assessment of transfer to food of animal origin and risk of antibiotic resistance. Communication orale au European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology International Congress-Bruges (Belgique). 2-5 juillet 2023.

Communications en congrès nationaux :

- Santos-Santórum Suárez, C., Gaugain, M., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M. & Sanders, P.: Contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques : risque de transfert vers les denrées d'origine animale et risque d'antibiorésistance. Poster présenté aux Journées de Recherche Porcine. 1-2 Février 2022.
- Santos-Santórum Suárez, C., Gaugain M., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Viel, A., Taillandier, J-F., Valentin C., Houée, P., Lagrée, M-P. & Sanders, P. : Antibiotic cross-contamination of feedingstuffs: assessment of transfer to food of animal origin and risk of antibiotic resistance. Poster présenté aux Journées Scientifiques et Doctorales de l'Anses. 18-19 Octobre 2022.
- Santos-Santórum Suárez, C., Gaugain, M., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Viel, A., Henri, J., Valentin, C., Houée, P., Taillandier, J-F., Lagrée, M-P. & Sanders, P. : Antibiotic cross-contamination of feedingstuffs: assessment of transfer to food of animal origin and risk of antibiotic resistance. Poster présenté aux Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé. 4-5 septembre 2023
- Santos-Santórum Suárez, C., Gaugain, M., Perrin-Guyomard, A. & Sanders, P.: Antibiotic cross-contamination of feedingstuffs: assessment of transfer to food of animal origin and risk of antibiotic resistance. Communication orale en 180 secondes aux Journées Scientifiques et Doctorales de l'Anses. 2-3 octobre 2023.

Liste des abréviations

- ABR** Antibiorésistance
- ACP** Analyse en Composante Principale
- ADME** Absorption, Distribution, Métabolisation et Excrétion
- AICV** Agents antimicrobiens d'importance critique en médecine vétérinaire
- AIV** Agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire
- ALEA** Animal Level of Exposure to Antimicrobials ou niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques
- AMEG** Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group
- AMOX** Amoxicilline
- ANMV** Agence Nationale du Médicament Vétérinaire
- ARSQ** Antimicrobial Resistance Selection Quantity ou quantité d'antibiotique qui sélectionne l'antibiorésistance
- ATIV** Agents antimicrobiens très importants en médecine vétérinaire
- AUC** Area Under the Curve ou aire sous la courbe
- BLSE** β -lactamases à spectre étendu
- BPF** Bonnes Pratiques de Fabrication
- CLSI** Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMI** Concentration Minimale Inhibitrice
- CP** Carbapénèmases
- CV** Coefficient de variation
- DAM** Distributeurs d'aliments médicamenteux
- DJA** Dose Journalière Acceptable
- dSPE** Dispersive Solid Phase Extraction ou extraction en phase solide dispersive
- ECOFF** Epidemiological cut-off value ou valeur seuil épidémiologique
- EFSA** European Food Safety Authority ou Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
- EIC** Extracted Ion Chromatograms
- EMA** Agence Européenne du Médicament
- ESI** Ionisation par electrospray
- EUCAST** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ou comité européen des antibiogrammes

F Biodisponibilité

FAM Fabricants d'aliments médicamenteux

FAO Food and Agricultural Organization ou Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

FARSC Feed Antimicrobial Resistance Selection Concentration ou concentration dans l'aliment qui sélectionne l'antibiorésistance

GC Gas chromatography ou chromatographie gazeuse

HILIC Hydrophilic interaction liquid chromatography ou chromatographie liquide à interaction hydrophile

HRMS High Resolution Mass Spectrometry ou Spectrométrie de Masse à Haute Résolution

LC Liquid chromatography ou chromatographie liquide

LLE Liquid-Liquid Extraction ou extraction liquide-liquide

LLOQ Lower limit of quantification ou limite inférieure de quantification

LMR Limite Maximale de Résidus

LNR Laboratoire National de Référence

MLST MultiLocus Sequence Typing

MRM Multiple Reaction Monitoring

MRT Mean Residence Time ou temps moyen de résidence

MS Mass spectrometry ou spectrométrie de masse

MSC Minimal Selective Concentration ou Concentration Minimale Sélective

NCA Non-Compartmental Analysis ou analyse non compartimentale

NO(A)EL No Observed (Adverse) Effect Level ou dose sans effet nocif observé

OMS Organisation Mondiale de la Santé

OMSA Organisation Mondiale de la Santé Animale

OTC Oxytétracycline

PCR Polymerase Chain Reaction

PE Profil d'exactitude

PKPop Pharmacocinétique de population

PLS Partial Least Squares ou régression des moindres carrés partiels

PLS-DA Partial Least Squares-Discriminant Analysis ou analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels

PM Phase mobile

PMSC Concentration Minimale Sélective Prédite

PS Phase stationnaire

PS/PC Plans de surveillance et plans de contrôle

QC Quality control ou contrôle de qualité

qPCR PCR quantitative

QuEChERS Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe ou rapide, facile, abordable, efficace, robuste et sûr

SDMT Sulfadiméthoxine

SE Standard d'étalonnage

SLE Solid-Liquid Extraction ou extraction solide-liquide

SPE Solid Phase Extraction ou extraction en phase solide

SV Standard de validation

TMP Triméthoprime

ToF Time of flight ou temps de vol

TPSA Topological Polar Surface Area ou aire de la surface polaire topologique

TQ Triple quadripôle

Tr Temps de rétention

UE Union Européenne

ULOQ Upper limit of quantification ou limite supérieure de quantification

US Unispray

Introduction générale

L'utilisation responsable des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire est un sujet de santé publique nécessaire afin de maintenir l'efficacité des traitements. Pour faire face à l'antibiorésistance, l'usage des antibiotiques comme promoteurs de croissance en élevage est interdit dans l'Union Européenne (UE) depuis 2006 et seule l'utilisation en tant que médicament vétérinaire est autorisée. Pour leur administration, plusieurs formes pharmaceutiques sont disponibles, dont les prémélanges médicamenteux, qui sont des formes orales rajoutées aux aliments afin de constituer les aliments médicamenteux. Pendant la fabrication, le transport ou le stockage de ce type d'aliment, une contamination croisée peut se produire entre les aliments médicamenteux et les aliments non médicamenteux, entraînant la présence non désirée d'antibiotiques dans ces derniers. Cette problématique a fait l'objet d'un rapport publié par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO, *Food and Agriculture Organization*) en 2019 et d'un autre publié par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, *European Food Safety Authority*) en 2021.

L'exposition non maîtrisée des animaux de rente à des faibles concentrations d'antibiotiques peut entraîner, d'un côté, la sélection de bactéries résistantes dans le microbiote intestinal des animaux et, d'un autre côté, le dépassement des Limites Maximales de Résidus (LMR) dans les denrées. Dans les deux cas, la présence de résidus d'antibiotiques dans l'alimentation animale présente un risque pour le consommateur et l'environnement d'être exposé à des antibiotiques ou des bactéries résistantes. Cette exposition non maîtrisée peut présenter également un risque économique pour l'éleveur en cas de dépassement des LMRs.

Les objectifs de ces travaux ont été d'étudier chez des porcs exposés à un aliment contaminé par des antibiotiques, les conséquences sur les concentrations d'antibiotiques dans les tissus et sur l'évolution de la résistance dans le microbiote intestinal.

Ce mémoire est divisé en trois parties :

- La première partie rappelle la situation actuelle sur l'utilisation des antibiotiques en élevage porcin, notamment sous forme de prémélanges médicamenteux et la problématique de la contamination croisée des aliments non médicamenteux. Les

risques chimiques et biologiques associés à cette contamination croisée sont présentés ainsi que les méthodologies utilisées pour les évaluer. Enfin, la question et les sous questions de recherche de la thèse sont posées.

- La deuxième partie présente les résultats des travaux réalisés au cours de cette thèse sous forme de trois articles scientifiques (un accepté et deux soumis).
- La troisième et dernière partie est composée d'une discussion suivie des perspectives et une conclusion générale des travaux de recherche.

**PARTIE I : CONTEXTE
SCIENTIFIQUE,
OBJECTIFS ET
METHODOLOGIE**

I- Etat de l'art

1. Elevage porcin et traitements antibiotiques

1.1. Elevage porcin

1.1.1. Représentation dans le monde et en France

En 2021, le porc est la deuxième viande la plus consommée dans le monde après la volaille et la plus consommée en Europe. Bien que sa consommation mondiale soit en baisse dans la dernière décennie, la viande porcine est la viande la plus consommée en France, représentant 37% de la viande totale consommée par habitant (31,7 kg équivalent carcasse par habitant par an en 2021, figure 1B) [1-3] .

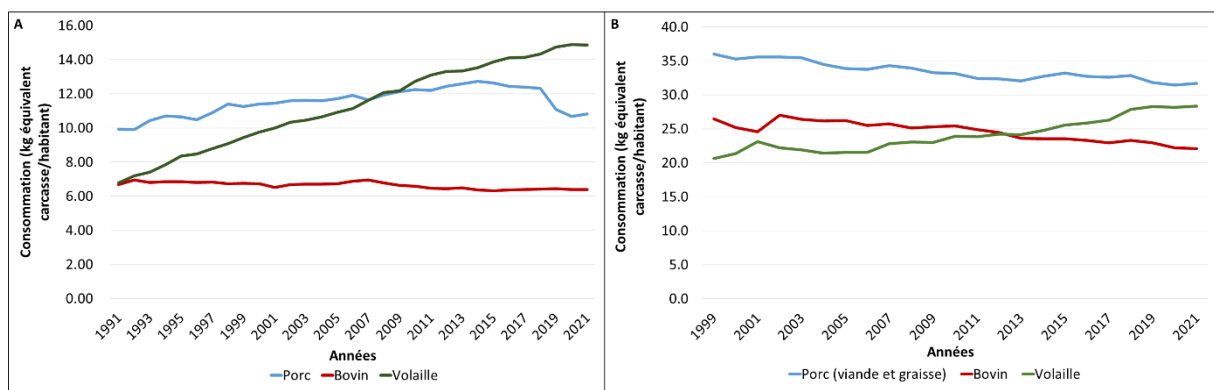


Figure 1. A) Consommation mondiale de viande entre 1991 et 2021 en kg équivalent carcasse par habitant. (Source : OCDE). B) Consommation française de viande entre 1999 et 2021 en kg équivalent carcasse par habitant (source : Agreste).

Depuis 1961, la production porcine mondiale n'a cessé d'augmenter, augmentation principalement liée à la production chinoise (figure 2). Au niveau européen, la France constitue le troisième pays producteur de porc derrière l'Espagne et l'Allemagne [1]. En termes de cheptel, la France se situe comme quatrième pays européen avec 12,9 millions de têtes en 2021 [4]. La Bretagne est la première région française productrice de porc (la sixième région en Europe), avec 56% de la production nationale totale, suivie par les Pays de la Loire (11%) et la Nouvelle-Aquitaine (7%) [1, 5] (figure 3). Au sein de la production porcine totale

française, le label rouge constitue 3,7% et les porcs issus de l'agriculture biologique représentent 1,2% [1].

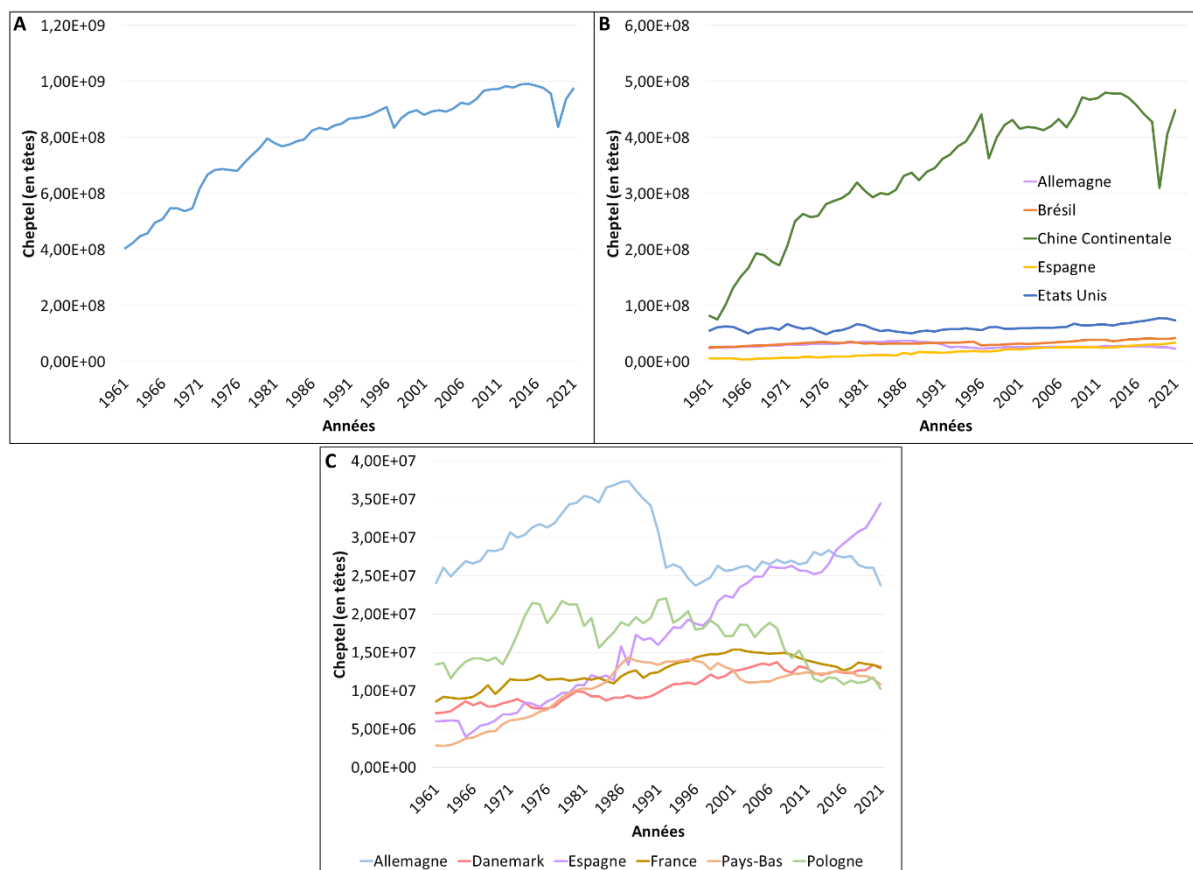


Figure 2. A) Evolution du cheptel mondial porcin entre 1961 et 2021. B) Evolution du cheptel mondial porcin par pays entre 1961 et 2021. C) Evolution du cheptel dans l'Union Européenne entre 1961 et 2021 (source : FAOSTAT)

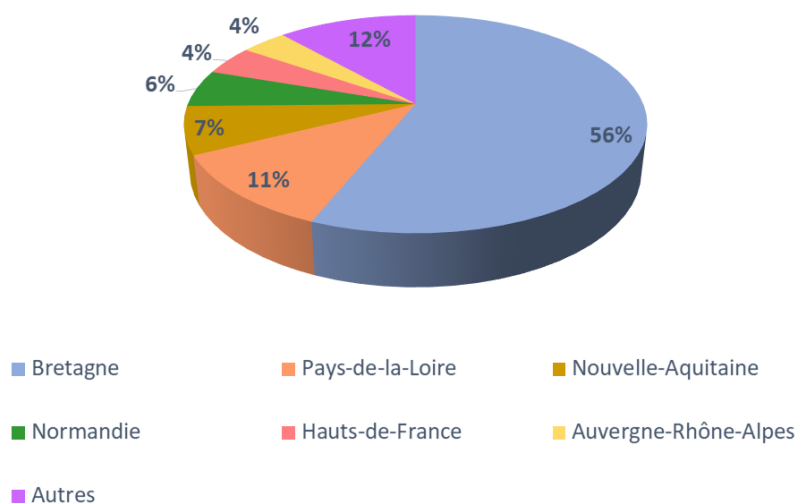


Figure 3. Cheptel porcin français par région en 2021 (source : Eurostat)

1.1.2. Aliments pour porcs

Définition et réglementation

Les aliments composés pour animaux sont définis dans le règlement (CE) N°767/2009 du Parlement européen et du Conseil [6] comme « *un mélange d'au moins deux matières premières pour aliments des animaux, comprenant ou non des additifs pour l'alimentation animale, qui est destiné à l'alimentation animale par voie orale, sous la forme d'un aliment complet pour animaux ou d'un aliment complémentaire pour animaux* ». L'Union Européenne, dans le cadre de sa législation, réglemente toutes les procédures de mise sur le marché et d'utilisation des aliments pour animaux [6], ainsi que tout ce qui concerne l'hygiène de ce type d'aliment et leur traçabilité [7]. De même, les matières premières à utiliser pour leur fabrication et les additifs autorisés sont également réglementés et listés [8, 9].

Aliments composés pour porc

Le porc est un animal omnivore et, afin de couvrir ses besoins nutritionnels, ses aliments sont fabriqués principalement à base de céréales (comme le blé ou le maïs), d'oléo protéagineux (comme le tournesol ou le colza) et de minéraux [10-12].

Pour atteindre les objectifs de production permettant de satisfaire la demande de consommation en élevage porcin, 50,7 millions de tonnes d'aliments composés industriels pour porc ont été fabriqués dans l'Union Européenne en 2021. En France, ce tonnage s'élevait à 4,8 millions la même année, ce qui place l'aliment porcin en troisième position en termes de production d'aliments composés pour animaux, derrière ceux destinés à la volaille et aux bovins (figure 4) [1, 13]. Selon un rapport publié par INAPORC en 2017, la fabrication industrielle représentait environ deux tiers du tonnage total d'aliments donnés aux porcs en France, alors que le tiers restant était fabriqué à la ferme [14].

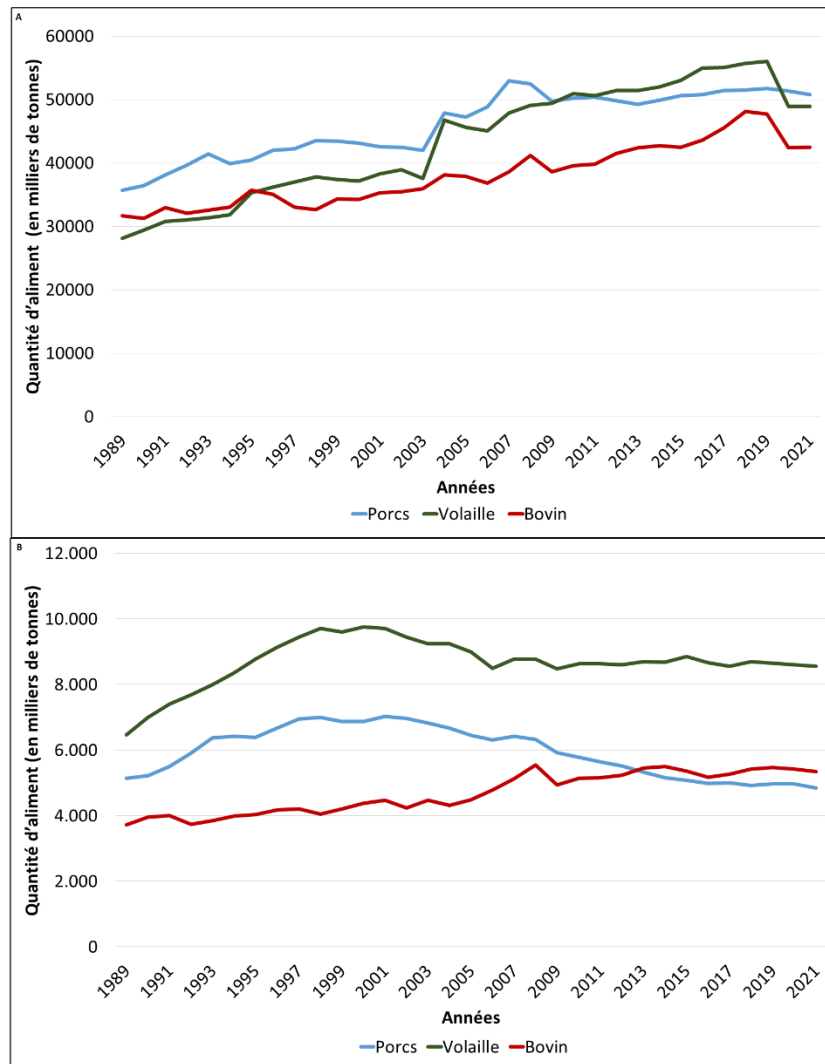


Figure 4. A) Production d'aliments composés pour animaux par espèce entre 1989 et 2021 dans l'Union Européenne. B) Production d'aliments composés pour animaux par espèce entre 1989 et 2021 en France (source : FEFAC)

1.2. Les antibiotiques en médecine vétérinaire

Dans l'Union Européenne, les antibiotiques ne sont utilisables chez les animaux que comme médicament vétérinaire. Cependant, dans le passé, les antibiotiques étaient également utilisés comme promoteurs de croissance. En 1986, la Suède devenait le premier pays à interdire l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance [15]. Puis, l'Union Européenne interdisait l'usage de l'avoparcine en 1997 et de la bacitracine, spiramycine, virginiamycine et tylosine en 1999 [16]. Finalement, depuis 2006 et avec le Règlement européen (CE) 1831/2003 [9], l'usage des antibiotiques comme additifs alimentaires et, donc,

comme facteurs de croissance est totalement interdit. L'objectif de cette mesure est de lutter contre l'antibiorésistance. Toutefois, cette utilisation est encore présente dans d'autres pays, comme c'est le cas de l'Australie, de la Nouvelle Zélande ou des Etats-Unis, par exemple [15, 16].

En médecine vétérinaire, l'usage des antibiotiques est principalement collectif quand il s'agit d'élevage intensif. L'administration se fait essentiellement par voie orale avec un objectif curatif ou préventif, même si ce dernier usage reste quand même limité. Leur utilisation est encadrée par la réglementation européenne [17].

1.2.1. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules capables de tuer les bactéries (bactéricides) ou d'inhiber leur multiplication (bactériostatiques). Selon leur origine ils peuvent être naturels, synthétiques ou semi synthétiques. Les antibiotiques peuvent être classés selon leur mode d'action :

- Les antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne, comme les β -lactamines ou les glycopeptides, en bloquant la synthèse du peptidoglycane [18], composant essentiel de la paroi qui protège la bactérie contre la lyse cellulaire et qui lui permet de résister aux stress mécaniques (comme les variations de pression osmotique, par exemple) [19, 20].
- Les antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines en interagissant avec le ribosome à deux niveaux différents : sur la sous-unité 30S, comme les tétracyclines ou les aminoglycosides, ou sur la sous-unité 50S, comme les macrolides ou les phénicolés [18].
- Les antibiotiques qui inhibent la synthèse de l'ADN, comme les quinolones et fluoroquinolones, en se fixant sur l'ADN et en bloquant les enzymes impliquées dans la réplication et la transcription de l'ADN : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV [21].
- Les antibiotiques qui désorganisent la membrane cytoplasmatique, comme les polymyxines ou les lipopeptides [22].
- Les antibiotiques qui bloquent la synthèse de l'acide folique, intermédiaire nécessaire pour la synthèse des acides nucléiques, comme les sulfamides et le triméthoprim [23].

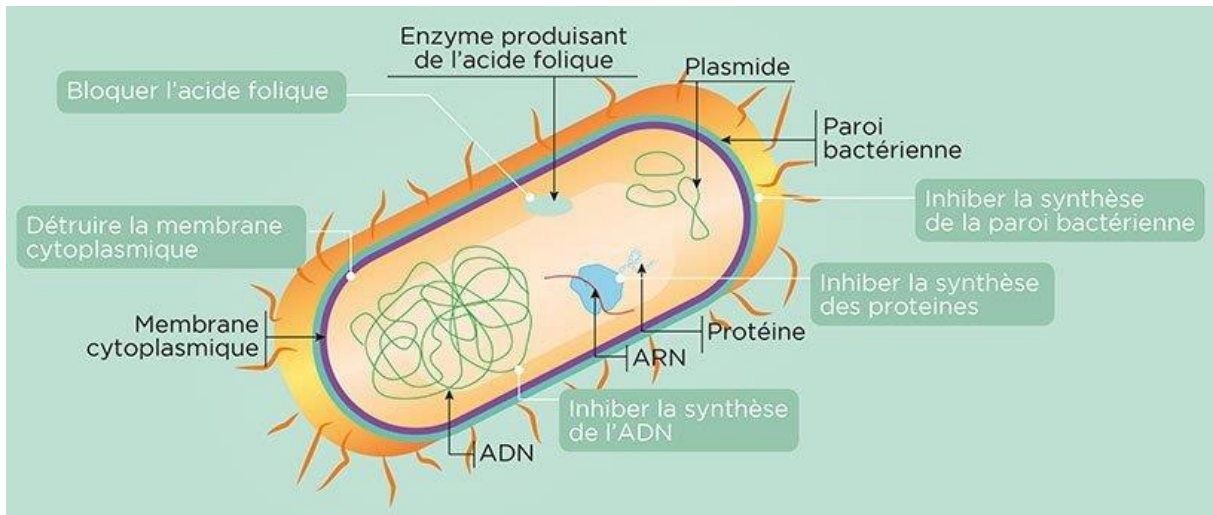


Figure 5. Principaux modes d'action des antibiotiques [24]

1.2.2. Utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire et en élevage porcin

En élevage, l'utilisation des antibiotiques peut répondre à trois objectifs. D'abord, le traitement thérapeutique, qui a pour objectif de guérir des animaux malades. Ensuite, le traitement métaphylactique, traitement de contrôle, qui vise à éviter la propagation d'une infection dans un élevage en traitant tous les animaux, à partir du moment où une fraction d'entre eux est malade. Finalement, le traitement prophylactique ou préventif, avec lequel on évite le développement d'une maladie chez des animaux exposés à un risque infectieux [25]. Les traitements métaphylactique et prophylactique ont un usage limité et il est souhaitable d'utiliser les antibiotiques en tant que traitement thérapeutique.

Dans le cadre de la lutte contre l'antibiorésistance, l'usage d'antibiotiques en médecine vétérinaire diminue régulièrement en France depuis la mise en place des plans d'action « Ecoantibio ». L'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ANMV) estime que, entre 2011 et 2021, l'exposition globale des animaux aux antibiotiques (ALEA : *Animal Level of Exposure to Antimicrobials*¹) a diminué de 47% en France. Pour les porcs cette exposition a diminué de 58,5%, cette réduction se situe en 3^{ème} position derrière celles de la filière cynicole, celles des animaux de compagnie (chiens et chats) et devant celles concernant les volailles et les bovins [26].

¹ L'ALEA représente le rapport entre le poids vif traité et le poids vif total d'une espèce animale

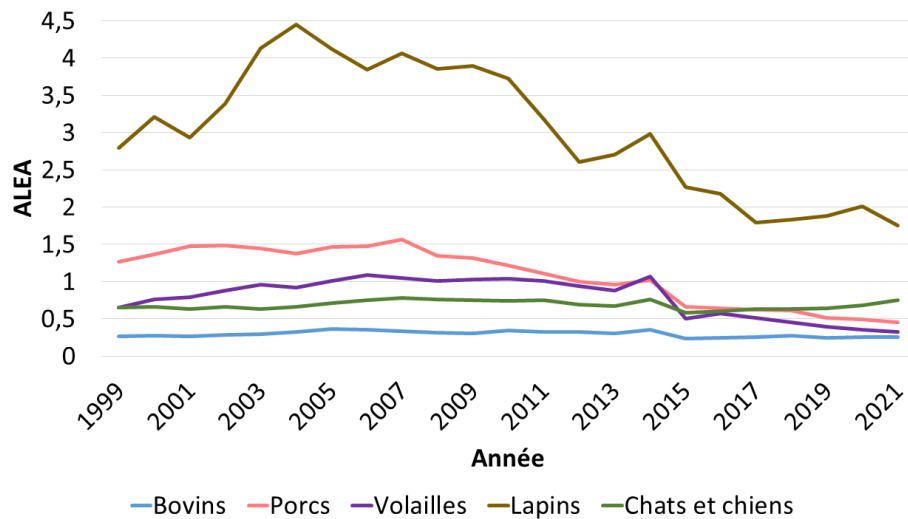


Figure 6. Evolution de l'ALEA par espèce animale entre 1999 et 2021 (source : ANMV [26])

En tonnage, la quantité d'antibiotiques vendue en France (toutes espèces confondues) a diminué de plus de 500 tonnes de substance active par rapport à 2011 (figure 7) [27]. Presque 30 % du tonnage total a été destiné au secteur porcin en 2021. Cela correspond à une exposition de presque 40 mg d'antibiotique par kg de poids vif abattu chez les porcs (face à 13 mg/kg de poids vif chez les bovins et presque 30 mg/kg de poids vif chez la volaille) [26]. La phase de post-sevrage correspond à la période pendant laquelle la quantité d'antibiotiques administrés est la plus élevée, suivie par la période d'engraissement des porcs [28].

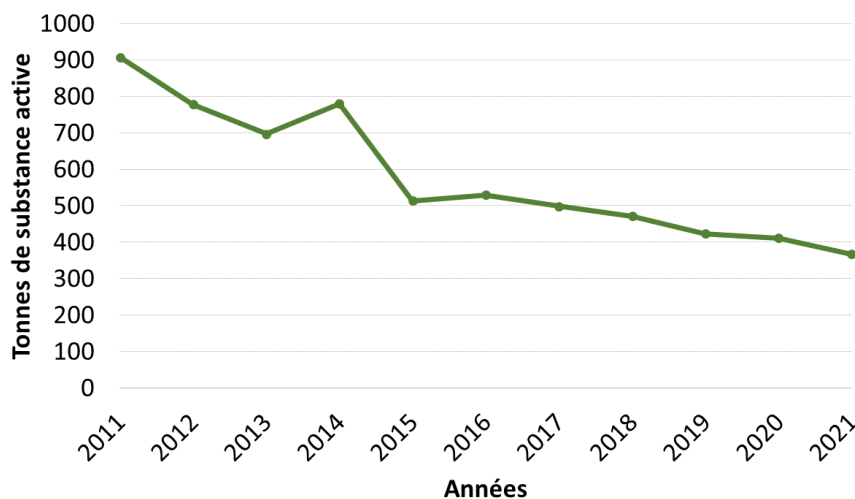


Figure 7. Evolution de la vente totale d'antibiotiques (toutes espèces confondues) en tonnes de substance active en France entre 2011 et 2021 (source : ESVAC)

La figure 8 présente le niveau d'exposition des porcs (ALEA) aux différentes familles d'antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire en France en 2021. Les antibiotiques les plus utilisés chez le porc sont :

- Pénicillines : appartenant à la famille des β -lactamines, elles sont utilisées pour le traitement d'infections respiratoires, gastro-intestinales ou même des infections cutanées [29].
- Tétracyclines : elles sont principalement utilisées dans le cadre d'infections respiratoires, gastro-intestinales et systémiques (comme la mycoplasmosse, la listériose ou la maladie de Glasser provoquée par *Haemophilus parasuis*) [29, 30].
- Macrolides : utilisés chez les porcs pour traiter des infections respiratoires et gastro-intestinales (comme celle provoquée par les mycoplasmes) [29, 31].
- Polypeptides : dans ce groupe se trouve la colistine, utilisée pour le traitement des infections gastro-intestinales provoquées par *E. coli* [29, 31].
- Aminoglycosides : utilisés pour le traitement d'infections respiratoires et intestinales [29, 32].
- Sulfamides et triméthoprime : administrés en association pour traiter des infections respiratoires et digestives [29, 33].
- Lincosamides : utilisés dans le traitement des infections digestives [29].
- Phénicolés : utilisés dans le traitement des infections respiratoires [29].

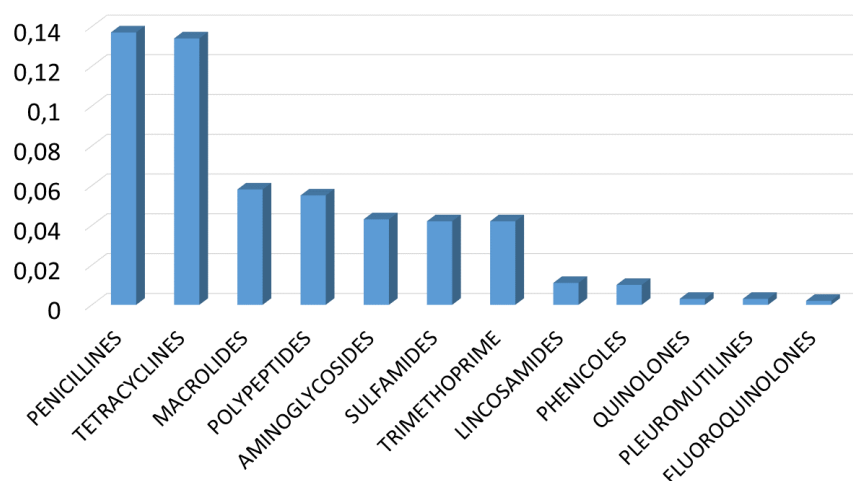


Figure 8. Exposition des porcs (ALEA) par famille d'antibiotiques en France en 2021 (source : ANMV [26])

Famille	Mode d'action	Bactéricide/ Bactériostatique	Principales molécules chez le porc
Pénicillines	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	Bactéricide	Amoxicilline
Tétracyclines	Inhibition de la synthèse de protéines (unité 30S du ribosome)	Bactériostatique	Oxytétracycline Doxycycline Chlortétracycline
Macrolides	Inhibition de la synthèse de protéines (unité 50S du ribosome)	Bactériostatiques	Tulathromycine Tylosine Tylvalosine
Polypeptides	Différents mécanismes	Bactériostatiques ou bactéricides	Colistine
Aminoglycosides	Inhibition de la synthèse de protéines (unité 30S du ribosome)	Bactéricides	Dihydrostreptomycine Néomycine Spectinomycine
Sulfamides	Inhibition de la synthèse d'acide folique	Bactériostatique	Sulfadiazine Sulfadiméthoxine
Diaminopyrimidines	Inhibition de la synthèse d'acide folique	Bactériostatique	Triméthoprim
Lincosamides	Inhibition de la synthèse de protéines (unité 50S du ribosome)	Bactériostatique	Lincomycine
Phénicolés	Inhibition de la synthèse de protéines (unité 50S du ribosome)	Bactériostatique	Florfenicol

Tableau 1. Antibiotiques utilisés chez le porc

Concernant la forme pharmaceutique, les formes orales (hors prémélanges) sont les plus vendues, suivies par les prémélanges médicamenteux et les formulations injectables, en Europe comme en France (figures 9 et 10) [26, 27]. Chez les porcs, les voies d'administration privilégiées sont les voies orale et parentérale, la voie topique représentant seulement 0,02% du tonnage total vendu en France.

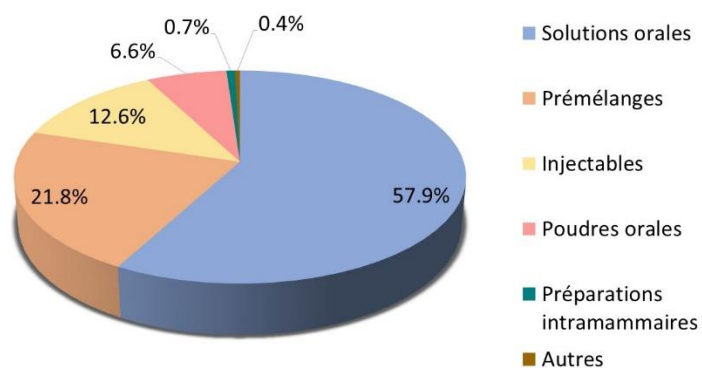


Figure 9. Répartition de la vente d'antibiotiques pour animaux producteurs de denrées alimentaires par forme pharmaceutique en 31 pays européens en 2021 (source : ESVAC)

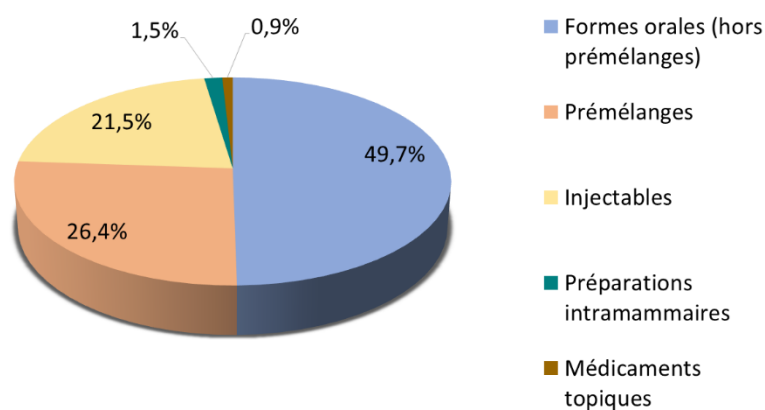


Figure 10. Répartition de la vente d'antibiotiques (toutes les espèces confondues) par forme pharmaceutique en France (source : ANMV [26])

1.2.3. Réglementation et surveillance

Les antibiotiques, comme tout médicament vétérinaire, sont soumis au règlement européen (UE) 2019/6 [17]. Cette législation définit tous les aspects concernant la mise sur le marché, la fabrication, l'importation et l'exportation, la délivrance, la distribution, la pharmacovigilance et l'administration des médicaments vétérinaires afin d'assurer un niveau élevé de protection de la santé animale, du bien-être animal, de l'environnement et de la santé publique.

Afin de minimiser et de mesurer les risques liés à l'utilisation des médicaments vétérinaires, plusieurs programmes de contrôle et de surveillance sont mis en place pour limiter

l'exposition humaine aux résidus de médicaments vétérinaires et surveiller l'antibiorésistance en élevage.

A. Surveillance et contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale

Limites Maximales de Résidus

Les Limites Maximales de Résidus (LMR) sont les concentrations maximales d'une substance active autorisées dans une denrée d'origine animale et sont fixées selon les lignes directrices du règlement (CE) N° 470/2009 [34]. Ces limites sont fixées par la Commission Européenne sur proposition de l'Agence Européenne du Médicament (EMA). Les LMR sont destinées à protéger les consommateurs de denrées d'origine animale vis-à-vis de dangers toxicologiques, pharmacologiques et microbiologiques associés à la présence de résidus de médicaments dans les aliments. Les valeurs des LMR sont précisées dans le règlement (UE) N° 37/2010 pour chaque espèce animale de destination et pour chaque denrée [35]. Les substances interdites, pour lesquelles aucune LMR ne peut être établie, sont classées dans le tableau 2 de ce règlement.

Les principes méthodologiques pour l'évaluation du risque et les recommandations pour sa gestion, permettant la fixation des LMR, sont précisés dans le règlement (UE) 2018/782 [36]. D'abord, à partir de l'ensemble des données issues des études toxicologiques et pharmacologiques et des connaissances scientifiques disponibles concernant la substance pharmacologiquement active, une dose sans effet nocif observé (NO(A)EL, *No Observed (Adverse) Effect Level*) est établie. Puis, cette dose est divisée par un facteur d'incertitude ou de sécurité, de 100 à 1000, qui permet d'obtenir la « Dose Journalière Acceptable » (DJA). Parallèlement, un résidu marqueur, défini dans le règlement (UE) 2018/782 [36] comme « *un résidu dont la concentration est dans un rapport connu avec la concentration des résidus totaux dans une denrée d'origine animale* », est choisi. Ceci permet donc d'établir un ratio résidu marqueur/résidus totaux dans chaque matrice. Egalement, un panier alimentaire prenant en compte la consommation journalière standard de denrées d'origine animale est conçu. De cette façon, en tenant compte de la DJA, du résidu marqueur, du ratio résidu marqueur/résidus totaux, du panier alimentaire, ainsi que de la répartition des résidus dans

les différentes denrées, les valeurs numériques des LMR sont établies. Ces LMR doivent assurer que, suite à la consommation du panier alimentaire standard, l'exposition totale à des résidus reste en dessous de la DJA.

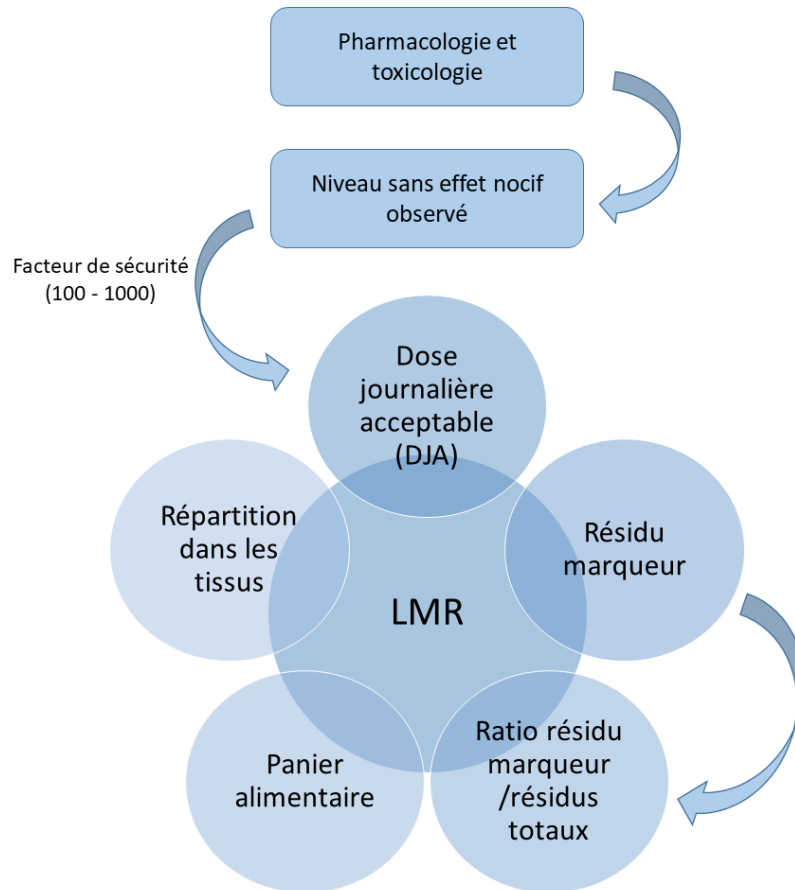


Figure 11. Procédure de calcul des LMR

Temps d'attente

Pour garantir le respect des LMR, des temps d'attente entre la dernière administration du médicament et la commercialisation des denrées issues d'animaux traités sont déterminés pour chaque médicament contenant la substance active, grâce aux données pharmacocinétiques des molécules. Afin de ne pas dépasser les LMR fixées, ces temps d'attente sont communiqués par le vétérinaire au détenteur des animaux qui doit les respecter [17].

Contrôles officiels

Afin de s'assurer du bon respect de la réglementation, des plans de surveillance et des plans de contrôle (PS/PC) sont réalisés dans les pays de l'Union Européenne conformément au règlement (UE) 2017/625 [37] et au règlement délégué (UE) 2022/1644 [38]. Les échantillons à analyser dans ces PS/PC concernent des prélèvements réalisés sur des animaux producteurs d'aliments, tels que les tissus ou les liquides biologiques, mais également les aliments pour animaux et l'eau. Les prélèvements de liquides biologiques ou d'aliments concernent les substances interdites uniquement. Ces contrôles officiels ont pour objectif de garantir le respect des LMR et des temps d'attente établis, ainsi que l'absence des substances interdites. Pour la réalisation de ces contrôles, des méthodes d'analyse des résidus de substances pharmacologiquement actives sont développées et validées comme indiqué dans le règlement d'exécution (UE) 2021/808 [39].

B. Surveillance de l'antibiorésistance

Les bactéries résistantes sélectionnées chez les animaux de rente peuvent être transmises à l'humain par contact direct (à travers des fluides et substances biologiques des animaux comme le sang, les fèces, les urines, etc.). Les personnes les plus exposées à ce risque sont les vétérinaires, les éleveurs et les personnes qui travaillent dans les abattoirs. Ces bactéries résistantes d'origine animale peuvent aussi être diffusées à l'homme indirectement via l'alimentation ou dans de rares cas, via l'environnement [40] (figure 12). Ces bactéries résistantes peuvent être pathogènes (*Salmonella*, *Campylobacter*) ou porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques transmissibles à des bactéries pathogènes pour l'homme. En cas d'infection humaine par ces agents pathogènes, cette résistance peut conduire à l'inefficacité du traitement et un échec thérapeutique. L'analyse de ces risques a conduit à la mise en place d'une surveillance de l'antibiorésistance en production animale.



Figure 12. Modes de transmission de la résistance à travers la chaîne alimentaire [41]

Surveillance des bactéries zoonotiques et commensales

Au vu du risque de la sélection et de la transmission à l'homme de bactéries résistantes aux antibiotiques d'origine animale, la surveillance de la résistance aux antimicrobiens est obligatoire en Europe depuis 2003 et réglementée par la directive 2003/99/CE [42]. Cette directive impose aux pays membres, une surveillance de l'antibiorésistance chez les bactéries d'animaux producteurs d'aliments et leurs denrées alimentaires, ainsi qu'une évaluation des tendances et sources de cette résistance. Les modalités pour l'application de cette directive sont précisées dans la décision d'exécution (UE) 2020/1729 [43].

Cette surveillance concerne des bactéries zoonotiques responsables d'infection chez l'homme telles que les salmonelles et les campylobacters, et des bactéries commensales, indicatrices du niveau d'antibiorésistance, telles que *E. coli* et *E. coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), céphalosporinases AmpC (AmpC) et carbapénèmases (CP). La surveillance est réalisée sur des animaux sains et sur quatre espèces animales productrices de denrées, avec un système de rotation pour l'échantillonnage : le poulet et la dinde les années paires, et le porc et le bovin les années impaires. Les échantillons incluent des prélèvements de viande fraîche et des échantillons de contenus caecaux. Les antibiotiques à surveiller, qui varient en fonction de l'espèce bactérienne à analyser, concernent différentes familles :

aminoglycosides, macrolides, pénicillines, céphalosporines, phénicolés, fluoroquinolones, tétracyclines, sulfamides, diaminopyrimidines, etc. Les seuils épidémiologiques (ECOFF, *Epidemiological cut-off value*) déterminés par le comité européen des antibiogrammes (EUCAST, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) sont utilisés pour distinguer les souches sauvages (sans mécanisme de résistance, souches dites « sensibles »), des souches non-sauvages (présentant un mécanisme de résistance, souches dites « résistantes ») [44]. Cette surveillance est menée en France par le Laboratoire National de Référence (LNR) de l'Anses Fougères depuis 1999.

Surveillance des bactéries pathogènes

Le réseau Résapath réalise en France depuis 1982, une surveillance de l'antibiorésistance des bactéries responsables d'infections chez les animaux de production (bovins, porcs, volailles...) et chez les animaux de compagnie (chiens, chats, chevaux...). Il s'agit d'un réseau coordonné par l'Anses où les laboratoires partenaires envoient leurs résultats d'antibiogrammes, préalablement demandés par le vétérinaire [45].

I- Etat de l'art

Règlement	Application
Règlement (CE) 767/2009	Aliments pour animaux
Règlement (UE) 2019/6	Médicaments vétérinaires
Règlement (CE) 470/2009	Fixation des LMR
Règlement (UE) 37/2010	Classification des substances et valeurs des LMR
Règlement (UE) 2018/782	Méthodologie d'évaluation des demandes de LMR
Règlement (UE) 2019/4	Aliments médicamenteux
Règlement (UE) 2017/625 et Règlement délégué (UE) 2022/1644	Contrôles officiels
Règlement d'exécution (UE) 2021/808	Méthodes d'analyse des résidus
Directive 2003/99/CE	Surveillance des zoonoses et agents zoonotiques et de l'antibiorésistance
Décision d'exécution (UE) 2020/1729	Modalités de surveillance de l'antibiorésistance

Tableau 2. Résumé des règlements européens concernant les aliments pour animaux, les médicaments vétérinaires, les LMR et leur respect, les aliments médicamenteux et la surveillance de la résistance aux antibiotiques

2. Aliments médicamenteux et contamination croisée

2.1. Les prémélanges et les aliments médicamenteux

Un prémélange médicamenteux est un médicament vétérinaire destiné à la fabrication d'aliments médicamenteux pour animaux [17]. Les aliments médicamenteux sont définis dans la réglementation européenne comme « *un aliment prêt à être directement administré aux animaux sans transformation supplémentaire, consistant en un mélange homogène d'un ou plusieurs médicaments vétérinaires ou produits intermédiaires et de matières premières pour aliments des animaux ou d'aliments composés* » [46].

Utilisés depuis longtemps, cette voie d'administration est pratique quand on doit traiter un grand nombre d'animaux. Cependant, la dose de médicament est moins maîtrisée car elle dépend de la consommation de nourriture [47]. De plus, leur usage comme traitement prophylactique est interdit.

En 2021, l'Anses et l'ANMV ont publié un rapport sur la cession des aliments médicamenteux en France, grâce aux données transmises par les fabricants et distributeurs de ce type d'aliments (FAM et DAM). Selon ce rapport, les porcs représentaient, en 2020, 63% du poids vif total traité via les prémélanges (figure 13) [48].

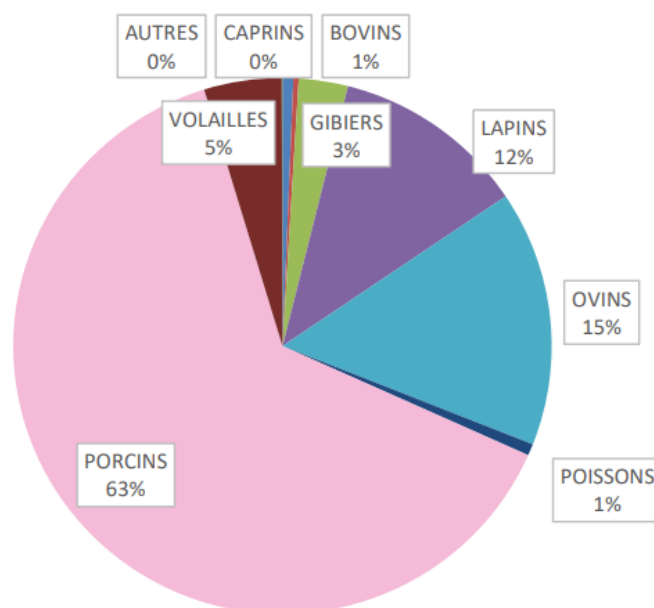


Figure 13. Répartition du poids vif traité via les aliments médicamenteux par espèce [48]

Cette voie d'administration en élevage est en baisse. De toutes les formes pharmaceutiques, ce sont les prémélanges médicamenteux qui ont vu leur usage diminuer le plus avec une baisse de l'ALEA de 18,2% depuis 2020, et de 79% depuis 2011 pour l'ensemble des espèces animales. Pour les porcs, cette diminution est également très significative : alors que l'utilisation d'injectables en élevage porcin n'a presque pas varié, l'exposition aux prémélanges médicamenteux a diminué de plus de 80%. Pour les autres formes orales (poudres et solutions), cette diminution est d'environ 48% [26].

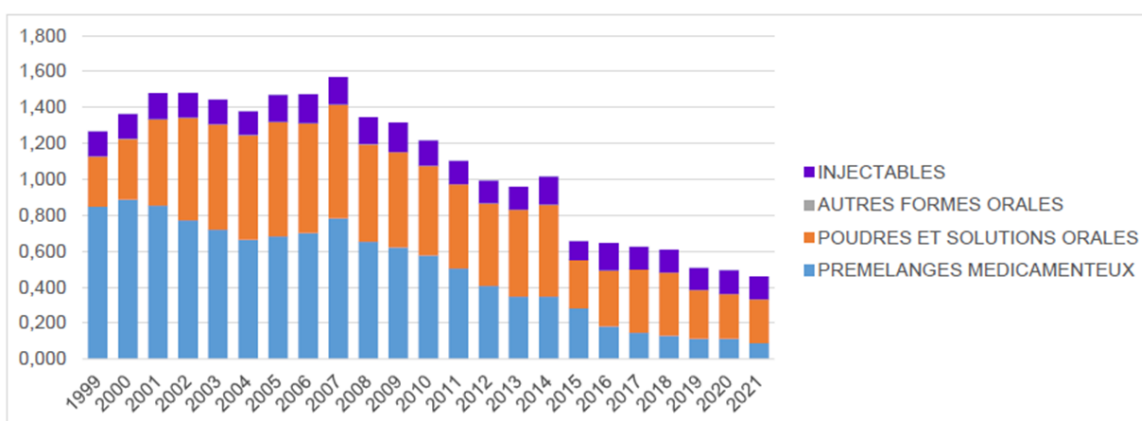


Figure 14. Evolution de l'exposition des porcs aux différentes formes pharmaceutiques entre 1999 et 2021 en France [26]

En 2020, au plan régional, l'exposition des porcs aux antibiotiques distribués via les aliments médicamenteux était la plus élevée en Auvergne-Rhône-Alpes, suivie par la Bretagne et les Pays de la Loire (figure 15).

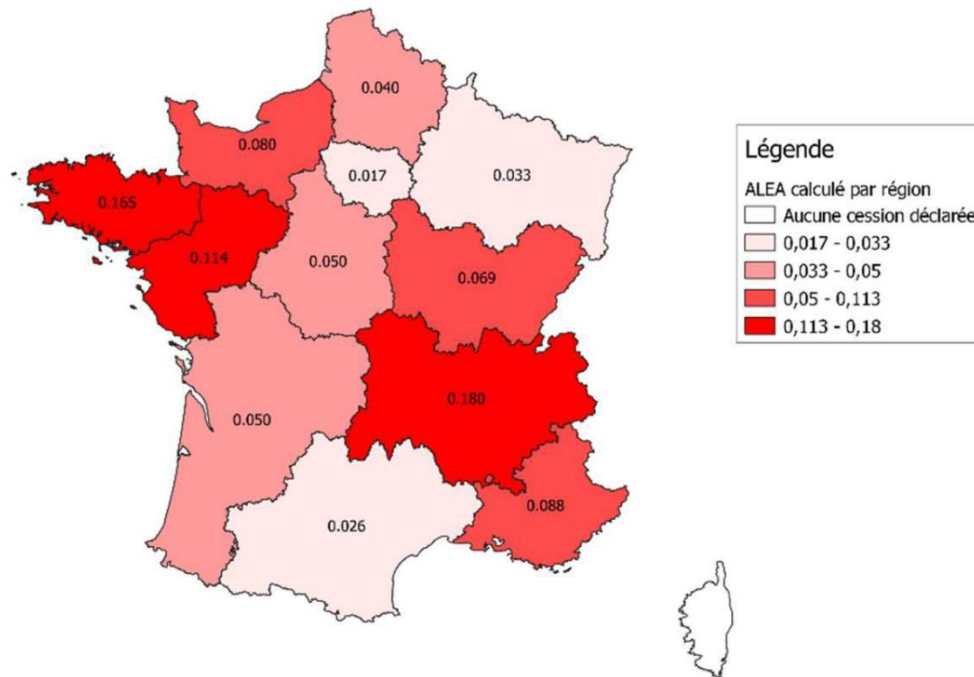


Figure 15. Exposition des porcs (ALEA) aux aliments médicamenteux par région en 2020 [48]

Les prémélanges médicamenteux, comme tous les autres types de médicaments vétérinaires, sont encadrés par le Règlement 2019/6 [17], jusqu'au moment où ils sont incorporés aux aliments médicamenteux, eux-mêmes encadrés par le Règlement 2019/4 [46]. Ces deux règlements couvrent tous les aspects de la fabrication jusqu'à l'administration des aliments médicamenteux. Comme pour tout autre médicament vétérinaire, l'utilisation d'aliments médicamenteux chez des animaux producteurs de denrées alimentaires, entraîne l'application d'un temps d'attente et le respect des LMR établies.

2.2. La fabrication des aliments médicamenteux et la problématique de la contamination croisée

En général, la fabrication des aliments médicamenteux et non médicamenteux s'effectue sur les mêmes lignes de production. En conséquence, le transfert de molécules médicamenteuses d'un lot d'aliment à un autre peut exister. Ce phénomène de transfert ou « carry-over » entraîne la contamination croisée entre les aliments médicamenteux et les non médicamenteux [49, 50]. En France, le Ministère de l'Agriculture et la Pêche a publié en 2007 des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) concernant les aliments médicamenteux dans lesquelles des limites de contamination croisée ont été fixées. Ces limites étaient de 5% de

contamination pour le premier lot suivant un lot d'aliment médicamenteux, et 1% pour le deuxième [51].

La survenue du « carry-over » est très influencée par les propriétés électrostatiques des substances et par leur force d'adhésion aux matériaux, ce qui complique le nettoyage des équipements [49, 52]. Pour faire face à ces transferts indésirables, les fabricants ont décidé de produire des préparations présentant des propriétés électrostatiques moindres et, même si cette mesure a permis de réduire le taux de contamination, le problème reste toujours présent [52]. D'autres facteurs tels que la taille des particules, la disposition de l'équipement et des infrastructures ainsi que les techniques de nettoyage des lignes de production, les procédures de manipulation ou encore l'erreur humaine ont un impact sur l'occurrence de ce carry-over [49, 50]. Le phénomène de ségrégation entre les composants du prémélange médicamenteux et les aliments peut apparaître au cours des processus de fabrication, de manipulation et de transfert. Il advient du fait des différences de formes, de densité et de taille des particules du prémélange et de celles de l'aliment. Ce phénomène peut conduire à des transferts d'antibiotiques entre aliments médicamenteux et non médicamenteux mais aussi à des concentrations non uniformes au sein des aliments médicamenteux [53, 54]. La contamination peut donc avoir lieu à toutes les étapes de fabrication de l'aliment [55]. De plus, elle peut avoir lieu pendant le transport ou le stockage des aliments au niveau de l'usine ou de la ferme. Filippitzi *et al.* [55] ont développé un modèle pour prédire le pourcentage de contamination croisée dans des aliments pour porcs. Selon celui-ci, si la production d'aliments médicamenteux représentait, 2% de la production totale d'aliments, alors environ 5,5% des aliments pour porcs fabriqués annuellement pourraient être contaminés par des antibiotiques. Selon ce même modèle, 1.80% des aliments seraient contaminés dans les usines de fabrication, 1.83% pendant le transport, et 1.84% au niveau de la ferme. En conclusion, ce phénomène est presque inévitable et difficile à contrôler [56].

Ce problème a déjà été mis en évidence dans plusieurs études. En 1997, Lynas *et al.* [57] ont analysé des échantillons d'aliments médicamenteux et non médicamenteux au Royaume Uni. Presque 24% des aliments médicamenteux contenaient des antibiotiques non déclarés et plus de 26% des aliments supposés être exempts d'antibiotiques étaient contaminés.

De même, Robert *et al.* [58] ont réalisé des plans de surveillance en Belgique pendant trois ans sur des aliments pour animaux en recherchant 13 médicaments vétérinaires, dont 11

antibiotiques. De la totalité des échantillons analysés, 20% étaient non conformes avec un taux de contamination supérieur à 1%, qui correspond au seuil de carry-over autorisé en Belgique. Les substances actives les plus retrouvées étaient le flubendazole (antiparasitaire), l'amoxicilline, la colistine, la sulfadiazine et le triméthoprim.

Entre 2013 et 2018, *Przeniosła-Siwczyńska et al.* [59] ont analysé plus de 300 échantillons en Pologne afin d'étudier la contamination croisée avec des tétracyclines. Les échantillons incluaient des aliments pour bovin, porc et volaille, ainsi que des prémélanges et des matières premières. Presque 12% des échantillons étaient contaminés à des concentrations allant de 0,3 à 49 mg/kg. Les tétracyclines retrouvées étaient la doxycycline, la chlortétracycline et l'oxytétracycline.

En France, des plans de surveillance et de contrôle ont été réalisés en 2017 et 2018 sur des aliments composés (non médicamenteux) pour lapin, porc et volailles avec pour objectif la recherche de présence d'antibiotiques [60]. Presque 200 échantillons (91 en 2017 et 101 en 2018), prélevés directement à la ferme, ont été analysés en ciblant 11 antibiotiques appartenant à différentes familles. Les résultats ont montré que 15% des échantillons étaient contaminés avec des concentrations supérieures à 1 mg/kg, avec parfois plusieurs antibiotiques. De plus, dans 44% des aliments, les concentrations dépassaient la limite de quantification de la méthode qui était 0,125 mg/kg. En ce qui concerne les aliments pour porc, les taux d'échantillons contaminés à des taux dépassant 1 mg/kg étaient de 14 % en 2017 et de 7% en 2018 [61]. Les antibiotiques les plus retrouvés appartenaient aux familles des sulfamides et des tétracyclines pour tous les aliments confondus. Dans les aliments pour porcs, les antibiotiques les plus retrouvés étaient la sulfadiazine, l'oxytétracycline, la chlortétracycline, la tylosine, la sulfadiméthoxine, le triméthoprim et l'amoxicilline (figure 16).

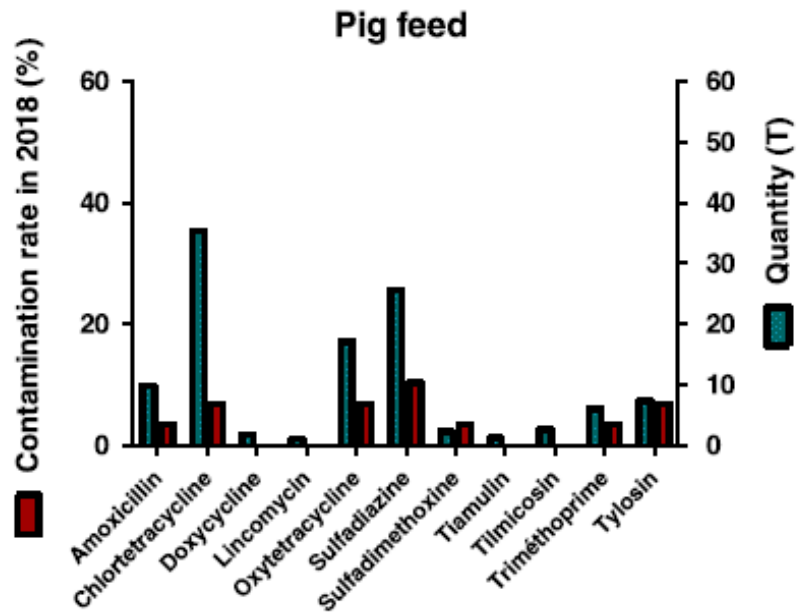


Figure 16. Taux de contamination retrouvé par antibiotique dans les aliments pour porc en 2018 (en rouge) comparé au tonnage vendu sous forme de prémélange (en vert) [60]

En 2019, l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a publié un rapport sur la problématique et les causes de la contamination croisée des aliments pour animaux [53]. Dans ce rapport ils ont également abordé les risques que cette contamination croisée pourrait entraîner pour la santé humaine si un transfert de résidus vers les denrées d'origine animale a lieu. Deux types de risques sont abordés : les risques chimiques (toxicité) et risques biologiques (sélection d'antibiorésistance). Finalement, les experts recommandent de réaliser une évaluation de risques afin de mettre en place des actions pour minimiser les conséquences des contaminations croisées.

Dans la suite de ce manuscrit, les risques associés à la présence non désirée d'antibiotiques dans les aliments pour animaux seront abordés.

3. Risques chimiques liés à la contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques

La présence d'antibiotiques dans les aliments non médicamenteux peut conduire à des effets indésirables chez les animaux non cibles. C'est le cas notamment de la lincomycine, antibiotique avec une autorisation chez le porc, dont l'administration à des vaches à des doses faibles, engendre des syndromes diarrhéiques, une perte d'appétit et une diminution de la production de lait [62]. Mais l'impact majeur de la présence d'antibiotiques dans les aliments non médicamenteux est la présence d'antibiotiques à des doses résiduelles dans les denrées d'origine animale, pouvant dépasser les LMR, et donc constituer un risque pour le consommateur.

3.1. Présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale et dépassement des LMR

Un résidu de médicament vétérinaire est défini comme la présence d'une substance entrant dans la composition du médicament ou de ses métabolites dans des produits animaux tels que la viande, le lait et les œufs.

La présence fortuite d'antibiotiques dans les aliments pour animaux, impliquant leur administration involontaire aux animaux de rente, entraîne le non-respect des temps d'attente réglementaires et, par conséquent, la possible présence de résidus d'antibiotiques et de leurs métabolites dans les denrées d'origine animale. Si ces résidus parviennent à dépasser les LMR, cela pourrait représenter un risque pour le consommateur. Comme pour les animaux, l'exposition des consommateurs à des antibiotiques pourrait conduire à des problèmes de toxicité. Les pénicillines, par exemple, peuvent provoquer des réactions allergiques chez les sujets sensibles, même à des faibles concentrations [63, 64]. De plus, la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale pourrait favoriser la sélection d'antibiorésistance [65, 66].

Contrôler et éviter la présence de ces résidus est important pour réduire au maximum l'exposition des consommateurs. Au niveau européen, des PS/PC sont mis en place pour détecter les non conformités et interdire la commercialisation de denrées ayant des

concentrations supérieures à la LMR. Les plans de surveillance ont un objectif d'évaluation de l'exposition du consommateur, quel que soit le niveau des résidus (au-dessus ou en dessous des limites réglementaires). Les prélèvements sont effectués de façon aléatoire. Les plans de contrôle ont pour objectif de détecter des non-conformités et les prélèvements par les services vétérinaires sont orientés sur la base d'informations préalables (état de l'animal, documents vétérinaires, ...). Les plans de contrôles ont pour but de réduire la mise sur le marché de denrées non conformes. Pour la réalisation de ces plans, des techniques analytiques qui permettent de détecter et de quantifier ces molécules sont mises en œuvre. En 2021, en production porcine, 7 non conformités (i.e. concentration dépassant la LMR) sur 1793 prélèvements (0,4 %) ont été mises en évidence pour les résidus d'antibiotiques [67]. Les antibiotiques retrouvés étaient la tulathromycine, la dihydrostreptomycine, la doxycycline, la sulfadiméthoxine et la lincomycine. Au niveau européen (Union Européenne, Islande, Norvège et Royaume Uni), sur 38180 échantillons provenant de la filière porcine, 0.09% étaient non conformes en 2021 [68].

3.2. Propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques des antibiotiques cibles

L'absorption et la distribution des médicaments sont influencées par plusieurs facteurs tels que la forme pharmaceutique, la voie d'administration et les propriétés physico-chimiques de la substance. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressées à quatre antibiotiques : l'amoxicilline, l'oxytétracycline, la sulfadiméthoxine et le triméthoprime. Ces molécules, de par leurs structures, ont des caractéristiques physico-chimiques et pharmacocinétiques différentes.

A. Amoxicilline

Appartenant à la famille des β -lactamines, l'amoxicilline fait partie des pénicillines du groupe A (pénicillines à spectre large). Son groupe amine lui confère une plus grande stabilité en milieu acide (et donc, à pH gastrique) par rapport à son prédécesseur la pénicilline G, ce qui rend possible son administration orale. Sa biodisponibilité orale (proportion du médicament qui arrive à la circulation systémique) est relativement faible chez les porcs, entre 25 et 31%

en fonction du statut à jeun ou non des animaux, selon une étude menée par Agersø & Friis [69].

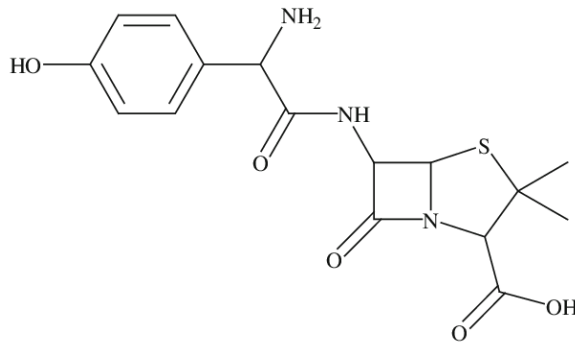


Figure 17. Structure de l'amoxicilline

B. Oxytétracycline

Cette molécule appartient à la famille des tétracyclines et possède un spectre d'action large. Les tétracyclines ont la capacité de se fixer aux ions métalliques (présents dans les aliments comme les produits laitiers ou la viande) et de former des chélates insolubles, ce qui diminue leur absorption orale et provoque leur élimination à travers les fèces. C'est pour cela qu'il faut éviter leur prise lors des repas. De plus, à pH gastro-intestinal, l'oxytétracycline est principalement sous forme ionisée, ce qui l'empêche de traverser les membranes [30]. La biodisponibilité orale de l'oxytétracycline chez le porc est très faible, comme ça a été démontré précédemment dans la littérature (d'environ 3%) [70].

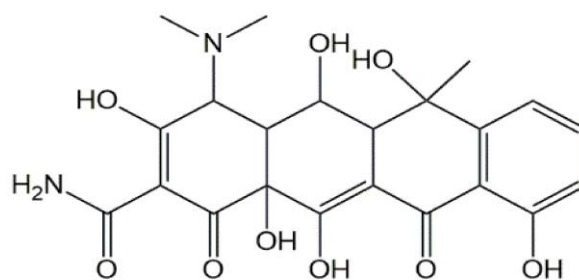


Figure 18. Structure de l'oxytétracycline

C. Sulfadiméthoxine

Appartenant à la famille des sulfonamides, antibiotiques à large spectre, la sulfadiméthoxine est un sulfamide sulfamido-substitué à action prolongée. Ce sulfamide est très liposoluble. Il s'agit d'une molécule amphotère dominée par le caractère acide faible de la fonction

sulfonamide, ce qui permet une bonne absorption orale car la molécule est faiblement ionisée. Les études pharmacocinétiques sur cette molécule chez les porcs sont limitées, mais les données disponibles estiment que cette molécule aurait une biodisponibilité orale d'environ 90% [71].

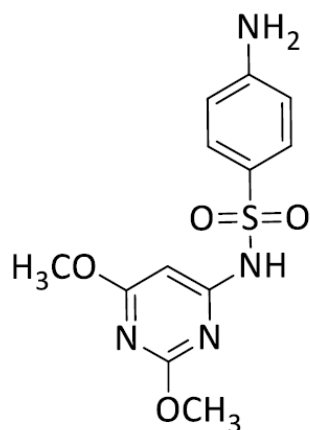


Figure 19. Structure de la sulfadiméthoxine

D. Triméthoprim

Le triméthoprim appartient à la famille des diaminopyrimidines, des antibiotiques à spectre large. Ce sont des molécules à caractère basique faible. Le triméthoprim est administré en association avec les sulfonamides. Sa biodisponibilité orale est d'environ 90-92% chez le porc [72]

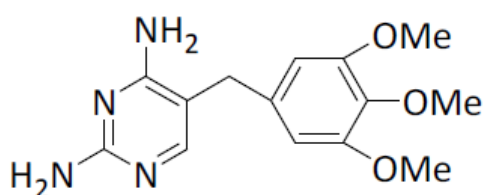


Figure 20. Structure du triméthoprim

Dans le tableau 3, plusieurs paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques sont comparés pour les quatre antibiotiques :

- LogP : aussi appelé coefficient de partage, qui permet de mesurer la solubilité d'une molécule. C'est le coefficient de distribution d'une molécule entre une phase organique et une phase aqueuse. Plus le coefficient est grand, plus la molécule est

lipophile et, dans le cas des antibiotiques, plus elle traversera facilement les membranes.

- TPSA (*Topological Polar Surface Area* ou aire de la surface polaire topologique) : ce paramètre mesure la surface totale polaire de la molécule. Plus ce paramètre est grand, plus de groupes hydrophiles seront sur la surface et plus difficile sera le passage de la molécule au travers des membranes.
- pKa : ce paramètre permet de définir la force d'un acide ou d'une base, permettant également de déterminer si la molécule sera sous forme ionisée ou non ionisée². Seule la partie non ionisée pourra traverser les membranes et être absorbée. Le pH intestinal chez les porcs est d'environ 6-7 [73].
- Biodisponibilité (*F*) : plus elle est élevée, plus le médicament est disponible dans la circulation sanguine.
- Volume de distribution : plus il est élevé, plus la distribution vers les tissus sera élevée.

Les trois premiers paramètres sont des paramètres physico-chimiques alors que les deux derniers sont des paramètres pharmacocinétiques.

Paramètre	Amoxicilline	Oxytétracycline	Sulfadiméthoxine	Triméthoprime
LogP*	0.87	-0.9	1.63	0.91
TPSA**	132.96	201.85	116.43	105.51
pKa	3.2 (acide) et 11.7 (amine primaire)*	3.2, 7.5 et 8.9 [74]	6.2, 6.3 (fonction sulfonamide) [33]	7.12*
Biodisponibilité	25-31% [69]	3% [70]	90% [71]	90-92% [72]
Volume de distribution (L/kg)	0.55-1.35 [69, 75]	1.4 [70]	0.2-0.4 [76]	1.1- 1.8 [72, 76]

*Données de PubChem **Données de drugcentral

Tableau 3. Paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques de l'amoxicilline, l'oxytétracycline, la sulfadiméthoxine et le triméthoprime

² Pour les acides (pour les bases, le contraire s'applique) :

- Si $\text{pH} > \text{pKa}$, la molécule sera principalement sous forme ionisée
- Si $\text{pH} = \text{pKa}$, la molécule sera 50% ionisée et 50% non ionisée
- Si $\text{pH} < \text{pKa}$, la molécule sera principalement sous forme non ionisée

4. Risques biologiques liés à la contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques : l'antibiorésistance

4.1. Antibiorésistance : définition et situation actuelle

L'antibiorésistance (ABR) désigne la capacité des bactéries à résister à l'action des antibiotiques utilisés dans le cadre d'un traitement thérapeutique. Ceci est actuellement un des plus grands problèmes de santé publique. Selon un rapport publié en 2022 [77], les auteurs estiment via un modèle statistiques que 1,27 millions de morts dans le monde en 2019 seraient directement attribuables à la résistance aux antibiotiques et qu'elle est associée à la cause du décès d'environ 5 millions de personnes. De même, O'Neill a estimé qu'en 2050, 10 millions de morts dans le monde seront attribuables à la résistance aux antibiotiques soit plus que les estimations de décès attribuables aux cancers [78, 79].

L'usage des antibiotiques chez les animaux est considéré pour l'homme, comme un facteur de risque de sélection et de dissémination de bactéries résistantes par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Au plan national et dans l'union européenne, des dispositifs de surveillance de l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire et de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries isolées chez l'animal ont été mis en place. En France, les dispositifs de suivi de la résistance chez les bactéries pathogènes isolées dans le cadre de diagnostics vétérinaires (réseau Résapath) et de plans de surveillance à l'abattoir documentent l'évolution de la résistance au regard des données d'exposition mesurées par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire.

Les différents dispositifs de surveillance ont montré une diminution de l'exposition des porcs aux antibiotiques en France entre 2011 et 2021 (diminution de l'ALEA de 58,5% [26]) et une augmentation du nombre de *E. coli* (bactérie indicatrice de l'ABR) sensibles à tous les antibiotiques, passant de 30% en 2019 à 44% en 2021 chez le porc sain à l'abattoir [80]. Néanmoins, ceci n'est pas le cas pour toutes les espèces animales et cela veut dire qu'il y a

encore 56% des souches *E. coli* chez le porc qui sont résistantes³ à au moins un antibiotique, dont 24% d'entre elles, résistent à trois antibiotiques ou plus en 2021 [67].

Les plans de surveillance réalisés en 2019 et en 2021 chez le porc ont montré que les pourcentages de résistance à la tétracycline chez les *E. coli* indicatrices étaient les plus élevés (50%), suivis par le sulfaméthoxazole, l'ampicilline et le triméthoprime (figure 21) [67, 81].

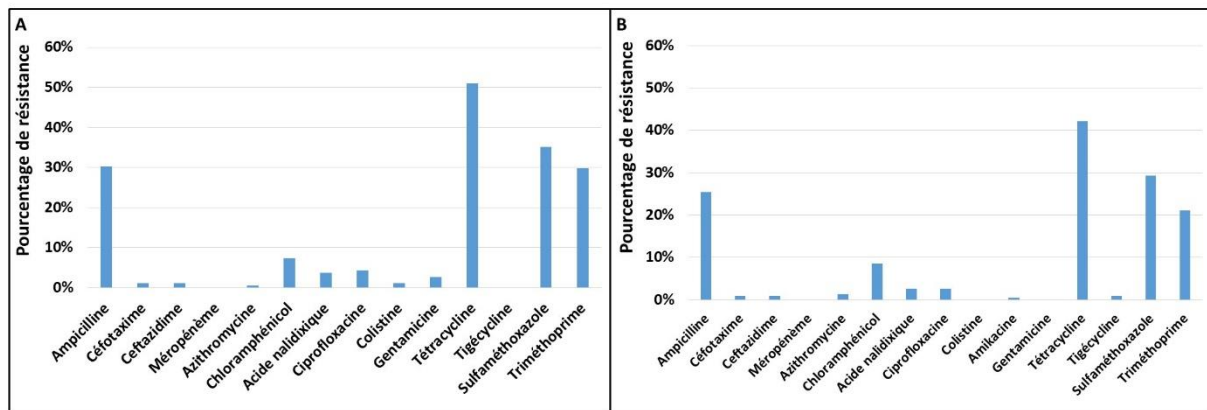


Figure 21. Pourcentage de résistance des *E. coli* indicatrices chez le porc en 2019 (A) et 2021 (B) (d'après [67, 81])

Chez les *E. coli* pathogènes isolés de porcs malades, la sensibilité aux fluoroquinolones (enrofloxacin et marbofloxacin) et aux céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération (ceftiofur et cefquinome) restait élevée (98-99%) en 2021. La sensibilité aux autres antibiotiques est en augmentation depuis 2011 (+19% pour la tétracycline, +14% pour la streptomycine ou +10% pour la gentamicine, par exemple). Néanmoins, pour l'amoxicilline et l'amoxicilline + acide clavulanique, la sensibilité des souches a légèrement diminué (-1,2% et -10%, respectivement) [45].

La figure 22 montre l'évolution de la sensibilité des *E. coli* pathogènes (toutes les pathologies) aux antibiotiques qui font objet de ces travaux de recherche au cours des dernières années en France.

³ Résistance épidémiologique, selon les seuils ECOFF établis par l'EUCAST

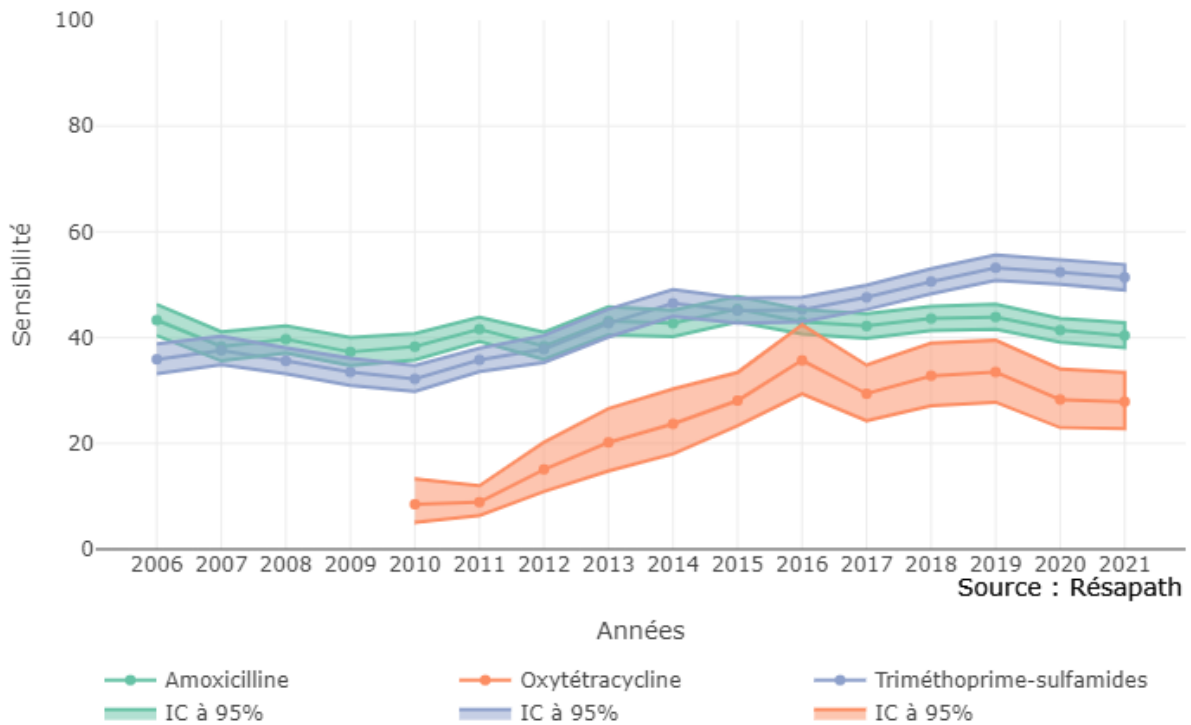


Figure 22. Evolution de la sensibilité aux 3 antibiotiques pour *E. coli*, toutes pathologies [82]

4.2. Types et mécanismes d'antibiorésistance

Il y a deux types de résistances aux antibiotiques : la résistance intrinsèque ou innée, et la résistance acquise.

- **Résistance innée** : ceci implique une caractéristique structurelle ou fonctionnelle de l'espèce bactérienne grâce à laquelle elle n'est pas sensible à l'antibiotique. C'est le cas des mycobactéries, qui n'ont pas de paroi, et donc elles sont insensibles aux β -lactamines ; ou des bactéries Gram négatifs, qui ont une membrane extérieure imperméable aux glycopeptides [83, 84].
- **Résistance acquise** : il s'agit de l'acquisition de mécanismes de résistance par une souche bactérienne d'une espèce normalement sensible. Ceci est un problème majeur de santé car cette résistance peut conduire à l'échec thérapeutique [84]. Le développement de la résistance acquise est favorisé par le mauvais usage des antibiotiques et par leur utilisation intensive, qui crée une pression de sélection sur les bactéries. Les mécanismes de résistance sont codés par des gènes de résistance et par des mutations chromosomiques. L'acquisition de nouveaux gènes peut se faire par transfert horizontal de matériel

génétique, par transformation (incorporation de l'ADN directement dans la bactérie), transduction (transfert à partir d'un bactériophage) ou conjugaison (transfert d'une bactérie à l'autre par contact direct) [85].

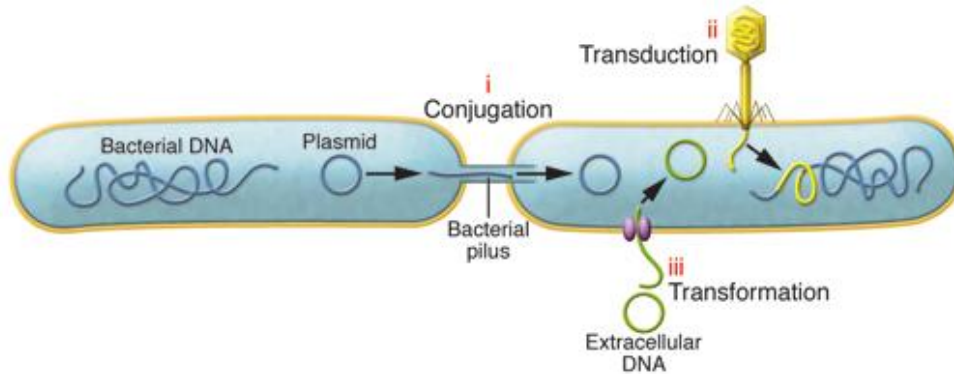


Figure 23. Mécanismes de transfert de gènes de résistance [86]

Il existe plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques :

- Modification ou destruction enzymatique de l'antibiotique afin de le neutraliser ou de l'inactiver. C'est le cas de la résistance aux β -lactamines avec la production des β -lactamases, qui hydrolysent l'anneau β -lactame, ce qui empêche leur union dans le site d'action et, donc, l'inhibition de la synthèse de peptidoglycane [84, 87]. Un autre exemple de ce type de mécanisme est l'acétylation, phosphorylation ou l'adénylation des aminoglycosides, ce qui provoque leur inactivation [85, 87].
- Modification ou protection de la cible pour réduire l'affinité de l'antibiotique et qu'il ne puisse plus se lier à sa cible. C'est le cas de la résistance aux fluoroquinolones avec la mutation des gènes codant les sous-unités GyrA, GyrB, ParC et/ou ParE de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV [88, 89] ou la résistance aux β -lactamines avec l'altération de la structure ou du nombre des protéines de liaison aux pénicillines (protéines impliquées dans la synthèse du peptidoglycane) [85].
- Modification de l'activité des pompes à efflux qui permettent d'expulser l'antibiotique en dehors de la cellule bactérienne. Des exemples de ce type de mécanisme sont la résistance aux tétracyclines, phénicolés ou β -lactamines [83, 84].
- Diminution de la perméabilité membranaire pour empêcher l'accès à la cible. C'est le cas des résistances aux phénicolés ou aux tétracyclines [83].

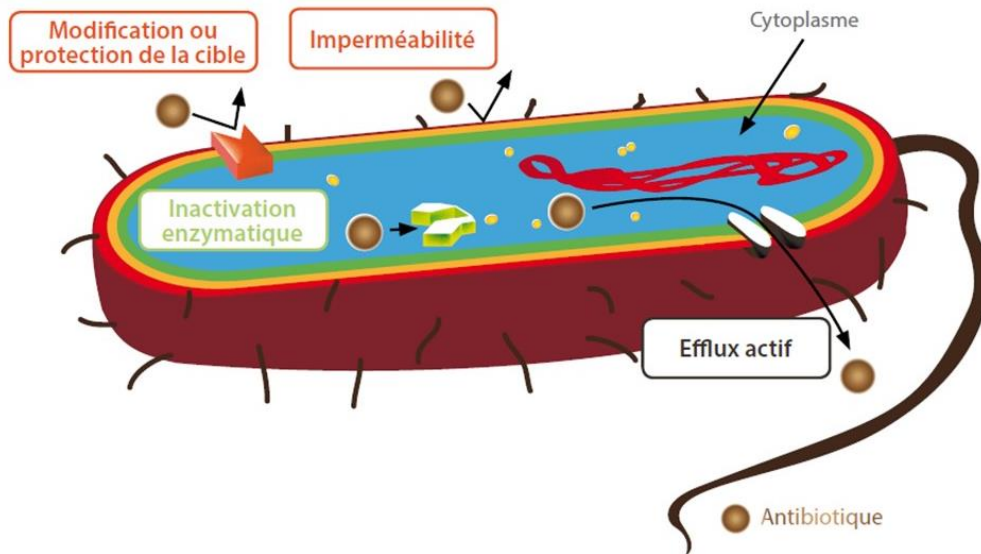


Figure 24. Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (d'après [25])

Les souches bactériennes peuvent être résistantes à plusieurs antibiotiques en même temps. Quand la résistance à plusieurs antibiotiques est due à un seul mécanisme, on parle de résistance croisée. Si, par contre, plusieurs mécanismes sont impliqués, on parle de co-résistance [84].

4.3. Mesures d'action pour lutter contre l'antibiorésistance

Afin de lutter et minimiser les taux d'ABR, plusieurs mesures et plans ont été adoptés dans le monde et en Europe.

4.3.1. Plans d'action

A. Plan d'action One Health contre l'antibiorésistance

Le concept One Health (une seule santé) est défini comme « *une approche intégrée et unifiée, qui a pour objectif d'équilibrer et optimiser de façon durable la santé des hommes, animaux et écosystèmes. Cette approche reconnaît que la santé des humains, des animaux domestiques et sauvages, des plantes et de l'environnement au sens large (en incluant les écosystèmes) sont étroitement liés et interdépendants* » [90]. Cette démarche One Health est mise en place par la commission européenne dans le cadre du plan européen pour combattre le développement de l'antibiorésistance (figure 25) [91].

L'objectif principal de ce plan est de préserver les traitements efficaces contre les maladies infectieuses humaines et animales. Pour l'atteindre, les actions à mettre en place sont basées sur trois axes :

- Mettre en place les meilleures pratiques au niveau de l'UE : meilleure surveillance, meilleures mesures et plans de contrôle, promouvoir un usage responsable des antibiotiques...
- Promouvoir la recherche, approfondir les connaissances afin de trouver des nouvelles solutions pour prévenir et traiter les maladies infectieuses d'étiologie bactérienne ainsi qu'améliorer leur diagnostic, développer des nouveaux vaccins...
- Créer des partenariats, renforcer la présence de l'UE au niveau mondial et coopérer avec les pays en voie de développement, car on vit dans un monde interconnecté et l'ABR est une problématique globale.

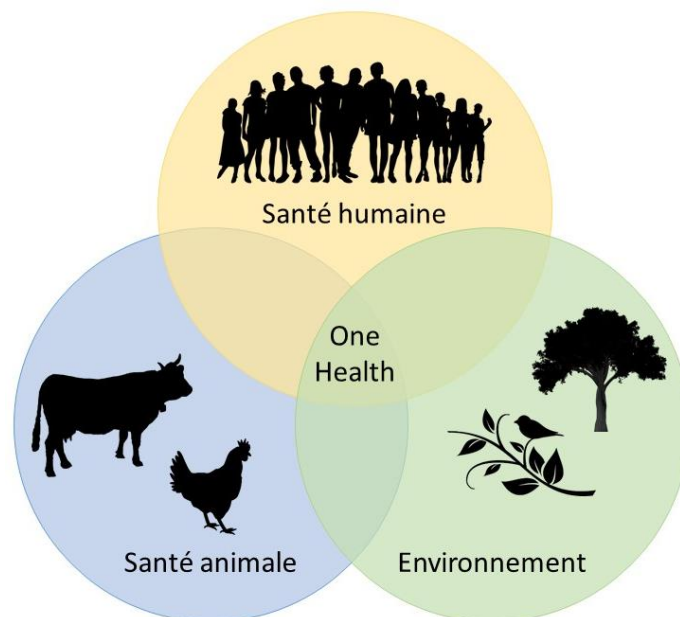


Figure 25. Concept « One health »

B. Stratégie « Farm to fork »

Avec l'objectif d'atteindre un système alimentaire plus durable et équitable, la stratégie « Farm to fork » considère que l'agriculture joue un rôle primordial dans le développement d'une chaîne alimentaire durable [92]. Afin de combattre l'antibiorésistance, la Commission Européenne vise avec ce plan à réduire de 50% les ventes d'antibiotiques chez les animaux d'élevage et en aquaculture en 2030.

C. Plan Ecoantibio

Le plan Ecoantibio est un plan français pluriannuel instauré par le Ministre de l'Agriculture et de l'Alimentation. Le plan Ecoantibio 1 (2012-2017) [93] avait comme objectif de réduire de 25% en 5 ans l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire ainsi que de réduire l'utilisation des antibiotiques d'importance critique en médecine vétérinaire (fluoroquinolones et céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} génération). Ce plan a été un succès et a permis de réduire de 37% l'exposition des animaux aux antibiotiques [94]. Le plan Ecoantibio 2 (2017-2021) avait pour objectif d'évaluer les impacts du premier plan, de poursuivre les actions engagées et de maintenir la tendance à la baisse de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire [94, 95]. De même, ce plan avait deux objectifs quantitatifs : réduire de 50 % l'exposition à la colistine en filière bovine, porcine et avicole ; et baisser de 50 % la prévalence d'*E. coli* BLSE sur les prélèvements de viande de volailles au stade de la distribution.

Pour atteindre tous ces objectifs, 4 axes ont été abordés :

- Développer les mesures de prévention des maladies infectieuses et faciliter le recours aux traitements alternatifs
- Communiquer et former sur les enjeux de lutte contre l'antibiorésistance, sur la prescription raisonnée des antibiotiques et sur les autres moyens de maîtrise des maladies infectieuses
- Mettre à disposition des outils d'évaluation et de suivi du recours aux antibiotiques, ainsi que des outils pour leur prescription et administration responsables
- S'assurer de la bonne application des règles de bon usage au niveau national et favoriser leur adoption aux niveaux européen et international

Les deux objectifs chiffrés de ce deuxième plan Ecoantibio 2 ont été atteints [96]. En raison du succès des deux premiers, le plan Ecoantibio 3 est en cours de préparation.

4.3.2. Catégorisation des antibiotiques

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, l'OMS et l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA) ont élaboré, respectivement, une liste d'antimicrobiens d'importance critique en médecine humaine et vétérinaire. Dans ce cadre, l'EMA a catégorisé en 2019 les antibiotiques à usage vétérinaire. Ces listes classent les antibiotiques en fonction

de leur risque de sélection de résistances, et donnent une criticité plus élevée à ceux qui constituent, pour certaines infections, la seule solution thérapeutique existante en médecine humaine. Grâce à ces critères, il est possible d'établir des priorités dans le choix des antibiotiques lors de la prescription d'un traitement. L'objectif est de lutter contre l'antibiorésistance en promouvant une utilisation responsable et prudente des antibiotiques.

A. Catégorisation internationale des antibiotiques de l'Organisation Mondiale de la Santé

La première liste des antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine (liste CIA) de l'OMS a été créée en 2005 mais elle est fréquemment actualisée, avec sa dernière version en 2018 [97]. Cette catégorisation divise les antibiotiques utilisés en médecine humaine en trois classes :

- Antibiotiques d'importance critique, où on retrouve les quinolones, les céphalosporines ou les aminopénicillines (comme l'amoxicilline)
- Antibiotiques hautement importants, où on retrouve les tétracyclines, les sulfamides et le triméthoprime
- Antibiotiques importants

Cette catégorisation est basée sur deux critères : si la classe d'antibiotiques est la seule option disponible pour le traitement d'une infection humaine ; et si elle est utilisée pour traiter, soit des infections d'origine non humaine, soit des bactéries pouvant acquérir des résistances d'une source non humaine.

B. Catégorisation internationale de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale

Cette liste concerne les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire chez des animaux producteurs de denrées [98] et ils sont divisés en :

- Agents antimicrobiens d'importance critique en médecine vétérinaire (AICV), où on retrouve les aminopénicillines (comme l'amoxicilline), les tétracyclines, les sulfonamides et le triméthoprime
- Agents antimicrobiens très importants en médecine vétérinaire (ATIV)
- Agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire (AIV)

Pour cette catégorisation, deux critères ont été employés : le taux de réponse des Délégués des Etats membres de l'OIE à un questionnaire concernant l'importance des antibiotiques en médecine vétérinaire ; et le traitement d'affections animales graves et la disponibilité d'agents antimicrobiens de substitution.

C. Catégorisation européenne des antibiotiques selon l'Agence Européenne des Médicaments

L'Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group (AMEG) a créé une liste des antibiotiques en fonction de leurs conséquences pour la santé publique (classement OMS), du risque d'antibiorésistance chez l'homme suite à un usage en médecine animale et de la disponibilité d'alternatives thérapeutiques chez l'animal présentant un risque inférieur de résistance (classement OMSA) [99]. Cette liste est un outil de décision pour les vétérinaires. Dans cette classification, il y a quatre catégories d'antibiotiques (A, B, C et D), présentées dans la figure 26. Dans la catégorie A on retrouve les carbapénèmes, dans la catégorie B il y a les fluoroquinolones et les céphalosporines, et la catégorie C concerne les aminoglycosides. L'amoxicilline, les tétracyclines, les sulfonamides et le triméthoprime se trouvent dans la catégorie D.

<p style="text-align: center;">Catégorie A Éviter</p> <ul style="list-style-type: none"> • les antibiotiques de cette catégorie ne sont pas autorisés en médecine vétérinaire dans l'UE • Ils ne doivent pas être utilisés chez les animaux producteurs de denrées alimentaires • l'utilisation chez les animaux de compagnie est possible dans des circonstances exceptionnelles 	<p style="text-align: center;">Catégorie B Restreindre</p> <ul style="list-style-type: none"> • les antibiotiques de cette catégorie sont d'importance critique en médecine humaine; leur usage chez l'animal doit être restreint afin de limiter les risques pour la santé publique • leur utilisation doit être envisagée seulement s'il n'existe pas d'antibiotiques efficace au plan clinique dans les catégories C ou D • l'administration doit s'appuyer dans la mesure du possible sur un test de sensibilité antimicrobienne
<p style="text-align: center;">Catégorie C Attention</p> <ul style="list-style-type: none"> • des alternatives aux antibiotiques de cette catégorie existent en médecine humaine • pour certaines indications thérapeutiques vétérinaires, il n'existe pas d'alternative dans la catégorie D • l'administration est à envisager seulement s'il n'existe pas d'antibiotique efficace au plan clinique dans la catégorie D 	<p style="text-align: center;">Catégorie D Prudence</p> <ul style="list-style-type: none"> • à utiliser en traitement de première intention chaque fois que cela est possible • comme toujours, à utiliser avec prudence, seulement lorsque cela est nécessaire au plan thérapeutique

Figure 26. Catégories d'antibiotiques selon la catégorisation de l'EMA [99]

4.4. Antibiorésistance et contamination croisée des aliments pour animaux

4.4.1. Sélection de l'antibiorésistance par des faibles concentrations d'antibiotiques

La présence de résidus d'antibiotiques dans les aliments pour animaux ou encore dans les denrées d'origine animale expose les animaux et les humains à des faibles concentrations d'antibiotiques. Cela implique l'exposition des bactéries du microbiote intestinal (humain et animal) à des doses sous-thérapeutiques ou sous-inhibitrices d'antibiotiques qui peuvent favoriser la sélection d'ABR. L'exposition des bactéries à des fortes concentrations d'antibiotiques pendant un traitement est connue pour favoriser la sélection et le développement de résistance, mais l'impact d'une exposition à des concentrations sous-inhibitrices pourrait également favoriser ce phénomène. En fait, traditionnellement, on considérait que la fenêtre de sélection de résistance se trouvait entre la Concentration Minimale Inhibitrice⁴ (CMI ou MIC pour *Minimal Inhibitory Concentration*) de la population sauvage (sans mécanisme de résistance ; MIC_{susc}) et la CMI de la population résistante (avec un mécanisme de résistance acquis ; MIC_{res}). Dernièrement, Gullberg et al. [100] ont fait l'hypothèse que cette sélection peut avoir lieu à des concentrations en dessous de la CMI des populations sensibles, ce qui ouvrirait une nouvelle fenêtre de sélection et introduit le concept de Concentration Minimale Sélective⁵ (MSC par *Minimal Selective Concentration*) (figure 27).

⁴ Concentration la plus faible d'antibiotique qui empêche la croissance d'une bactérie

⁵ Concentration d'antibiotique la plus faible conférant un avantage compétitif à une souche résistante vis à vis d'une souche isogénique sensible

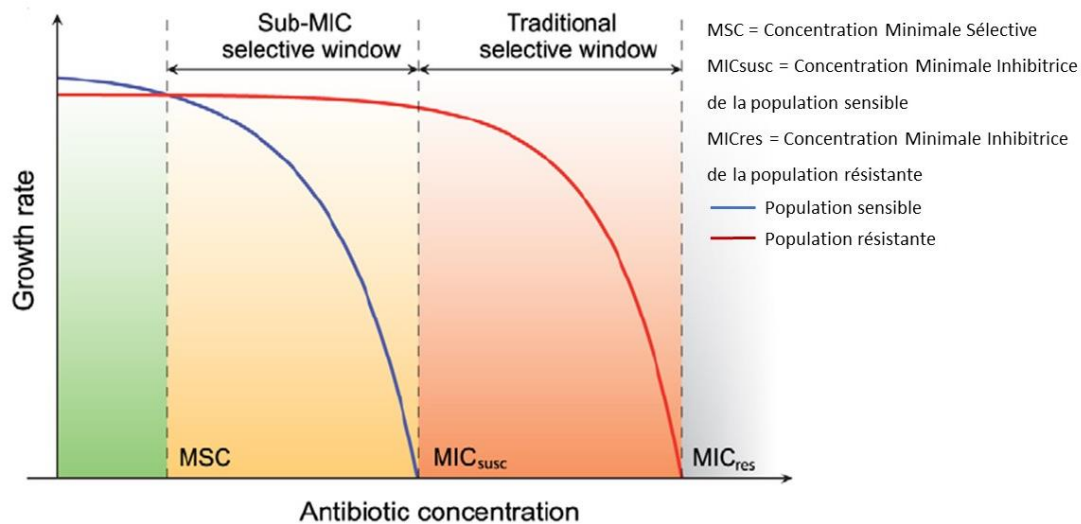


Figure 27. Représentation de la croissance bactérienne des populations sensible et résistante en fonction de la concentration d'antibiotique [100]

En général, l'acquisition d'une résistance sous une forte pression de sélection d'antibiotique entraîne un coût biologique (*fitness cost*) pour la bactérie, comme une diminution dans le taux de croissance, par exemple [85, 101]. A des fortes concentrations d'antibiotiques (doses thérapeutiques), les populations bactériennes sensibles seront inhibées ou tuées, et seulement les populations résistantes survivront, même celles avec un *fitness cost* élevé. A l'inverse, à des concentrations en dessous de la CMI, la croissance de la population sensible sera plus lente, mais elle survivra. Cela veut dire qu'il y aura une compétition avec la population résistante et seules les souches avec des mutations conférant une résistance avec un *fitness cost* faible seront compétitives. Par conséquent, ces mutations seront plus stables et il est moins probable que la résistance soit réversible en absence d'antibiotique [100, 102, 103].

L'impact des doses sous-thérapeutiques (ou sous-inhibitrices) sur la sélection de résistance a déjà été mis en évidence. Dans une étude menée par Gullberg et al. [100], des souches sensibles et résistantes de *Escherichia coli* et de *Salmonella enterica* ont été exposées à trois antibiotiques différents (tétracycline, streptomycine et ciprofloxacine) à des concentrations en dessous de la CMI. Leurs résultats ont montré que, à ces concentrations, une sélection des résistants, préexistants mais aussi *de novo*, est possible. De même, Peeters et al. [104] ont étudié l'impact *in vitro* de la doxycycline à des concentrations résiduelles sur la sélection de souches d'*E. coli* résistantes isolées à partir de fèces de porc, ainsi que sur le transfert des plasmides de résistance. Pour cela des expériences de conjugaison et de compétition entre

des souches sensibles et résistantes ont été réalisées. Comme pour l'étude précédente, une sélection de la souche résistante était observée, mais également une augmentation de la fréquence de transfert pour un des plasmides. De même, Moore et al. [105] ont exposé des souches sensibles, intermédiaires et résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* à des concentrations sous thérapeutiques de tobramycine, entraînant une augmentation de la CMI chez tous les isolats à la fin de l'étude.

In vivo, Lin et al. [106] ont montré une augmentation des taux de résistance dans la population fécale *E. coli* chez des porcs traités avec des doses sous-thérapeutiques de ceftiofur ou d'enrofloxacin, comparativement à des porcs contrôles. Dans l'étude animale menée par Holman et al. [107], une augmentation des bactéries anaérobies résistantes à la tylosine avait été observée chez des porcs qui avaient reçu une alimentation contenant cet antibiotique à des doses sous-thérapeutiques.

Ces exemples montrent que, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, de faibles doses d'antibiotiques peuvent entraîner la sélection d'ABR.

4.4.2. Rapport de l'EFSA

En septembre 2021 l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), en collaboration avec l'Agence Européenne du Médicament, a publié un rapport en réponse à une demande de la Commission Européenne sur l'impact de la présence de faibles concentrations d'antibiotiques dans les aliments pour animaux (en lien avec la mise en application du nouveau règlement 2019/4) [108]. Dans ce rapport, elle propose une méthodologie pour estimer les concentrations d'antibiotiques résultant d'une contamination croisée d'aliments pour animaux en dessous desquelles il n'y aurait pas d'émergence et/ou de sélection de bactéries résistantes dans le microbiote intestinal de l'animal. Sur la base de cette méthodologie décrite ci-après les experts ont proposé une valeur maximale de contamination croisée, à savoir la FARSC (pour *Feed Antimicrobial Resistance Selection Concentration*). Ce rapport concerne uniquement les espèces animales productrices de denrées. Les 24 substances actives, pour lesquelles cette estimation a été faite, sont des substances importantes en santé humaine et animale. Elles sont listées dans le tableau 4.

	Substance active	Famille		Substance active	Famille
1	Amoxicilline	B-lactamine	13	Tétracycline	Tétracycline
2	Amprolium	Anticoccidien	14	Oxytétracycline	Tétracycline
3	Apramycine	Aminoglycoside	15	Acide oxolinique	Quinolone
4	Chlortétracycline	Tétracycline	16	Paromomycine	Aminoglycoside
5	Colistine	Polypeptide	17	Pénicilline V	B-lactamine
6	Doxycycline	Tétracycline	18	Tiamuline	Pleuromutiline
7	Florfénicol	Phénicolé	19	Thiamphénicol	Phénicolé
8	Fluméquine	Quinolone	20	Tilmicosine	Macrolide
9	Lincomycine	Lincosamide	21	Triméthoprim	Diaminopyrimidine
10	Neomycine	Aminoglycoside	22	Tylosine	Macrolide
11	Spectinomycine	Aminoglycoside	23	Valnemuline	Pleuromutiline
12	Sulfonamides	Sulfamides	24	Tylvalosine	Macrolide

Tableau 4. Substances actives pour lesquelles l'EFSA a évalué les concentrations maximales de contamination croisée qui n'entraîneraient pas de sélection ou émergence de résistance

Concernant les espèces bactériennes retenues dans l'évaluation, celles-ci n'étaient pas limitées aux espèces pathogènes cibles incluses dans les indications thérapeutiques de chaque antimicrobien, mais étaient élargies à toutes les espèces bactériennes pour lesquelles des données de sensibilité étaient disponibles. Ce choix méthodologique a été fait afin de saisir l'amplitude de la distribution de sensibilité des bactéries intestinales et du rumen (commensales ou pathogènes) pouvant être exposées à des résidus d'antibiotiques chez l'animal après l'ingestion d'aliments.

Pour estimer les concentrations maximales de contamination croisée, les auteurs ont développé un modèle qui tient compte de la quantité maximale d'antibiotique dans le gros intestin qui ne sélectionne pas de bactérie résistante (ARSQ, par *Antimicrobial Resistance Selection Quantity*). Cette quantité est une valeur estimée, dérivée de l'équation pour déterminer la DJA microbiologique pour la fixation des LMR d'antibiotiques. Cette équation prend en compte la valeur de la MSC ou la MSC prédite (PMSC) si les données de MSC ne sont pas disponibles ; la quantité journalière de fèces excrétée par les animaux ; et des paramètres pharmacocinétiques des antibiotiques tels que la biodisponibilité orale et la quantité d'antibiotique absorbé qui est ensuite éliminée à travers l'intestin. La ration alimentaire

journalière des animaux est ajoutée à l'ARSQ pour donner une valeur de FARSC. Les données utilisées pour ce modèle proviennent de la littérature, de l'EMA ou encore des bases de données publiques comme l'EUCAST.

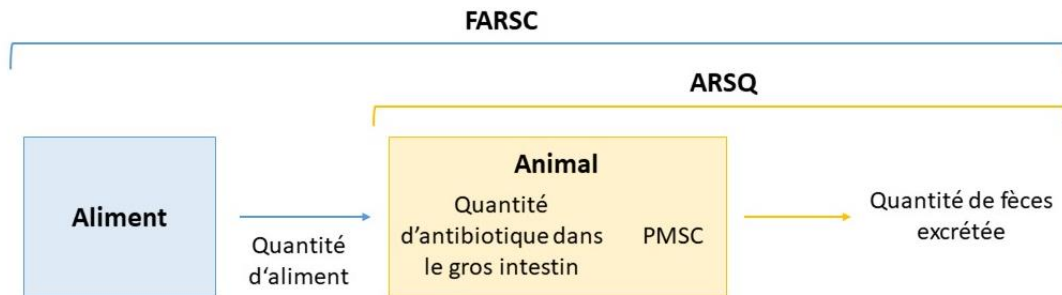


Figure 28. Représentation du calcul de la FARSC (d'après [108])

Plusieurs limites et incertitudes sont liées à cette formule :

- Limites liées aux paramètres pharmacocinétiques :
 - La possible sélection de résistance dans le petit intestin n'est pas prise en compte.
 - Le calcul est fait à partir de la quantité de fèces excrétées et non du volume du colon. Les concentrations d'antibiotiques entre ces deux endroits peuvent varier en fonction de l'absorption d'eau dans l'intestin.
 - D'autres facteurs, autres que la biodisponibilité, peuvent influencer la concentration d'antibiotique dans le colon, ce qui veut dire que ce paramètre pourrait être sur ou sous-estimé.
 - La méthode est basée sur l'exposition à un seul antibiotique.
 - La variabilité des données pharmacocinétiques dans la littérature induisent que les valeurs des FARSC soient un intervalle et non une concentration précise.
- Limites liées au calcul de la MSC ou PMSC :
 - Les valeurs de MSC sont calculées pour une seule souche ou espèce bactérienne, sans tenir compte de la complexité de l'environnement et, donc, de la présence d'autres espèces.
 - Le calcul des MSC a été fait pour deux espèces bactériennes, donc des extrapolations ont été réalisées pour les autres (PMSC). De plus, pour le calcul des PMSC, des CMI des pathogènes humains ont été utilisées et extrapolées pour des pathogènes animaux. Tout ça peut conduire à une mauvaise estimation de la valeur de la PMSC.

- Des extrapolations sont faites au sein d'une même classe d'antibiotique

Des valeurs de FARSC pour le porc ont pu être calculées pour certaines molécules et sont détaillées dans le tableau 5. Cependant, plusieurs facteurs empêchent l'estimation de la FARSC pour d'autres molécules, comme l'absence de données de CMI ou de MSC, l'absence de données suffisantes concernant la pharmacocinétique des molécules ou le manque d'études sur des espèces bactériennes autres que *E. coli* ou *Salmonella*. Finalement, sur les bases de données disponibles, les experts n'ont pu faire une estimation de la FARSC que pour six molécules sur 24, et seulement pour certaines espèces animales.

Antibiotique	FARSC (en mg/kg aliment)	
	Porcelets	Porcs pour engraissement
Florfénicol	$[2.07-125.00] \times 10^{-3}$	$[2.48-150.00] \times 10^{-3}$
Tétracycline/Chlortétracycline/ Oxytétracycline	$[0.21-1.07] \times 10^{-3}$	$[0.25-1.28] \times 10^{-3}$
Doxycycline	$[0.17-0.89] \times 10^{-3}$	$[0.20-1.07] \times 10^{-3}$
Triméthoprim	$[0.63-2.91] \times 10^{-3}$	$[0.76-3.49] \times 10^{-3}$

Tableau 5. Estimations des concentrations d'antimicrobiens dans l'aliment qui n'entraîneraient pas de sélection ni d'émergence de résistance [108]

Comme on peut voir dans le tableau 5, les FARSC estimées par l'EFSA sont des concentrations très faibles, et largement en dessous des concentrations retrouvées lors des plans de surveillance réalisés en France en 2017 et 2018 [60]. Ce sont également des concentrations très en dessous des concentrations actuellement acceptées par les BPF des aliments médicamenteux en France [51].

Des études supplémentaires seraient nécessaires afin d'approfondir la question de l'impact des concentrations résiduelles sur la sélection de la résistance, mais également pour générer des nouvelles données, utiles pour le calcul des FARSC des molécules manquantes. Ce projet de thèse vient compléter ce rapport en apportant des informations sur le risque de contamination croisée dans la sélection d'antibiorésistance.

II- Objectifs de la thèse et stratégie de recherche

Comme décrit dans la première partie de ce manuscrit, la contamination croisée des aliments pour animaux pourrait conduire à la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, mais également contribuer à la sélection de bactéries antibiorésistantes, transmissibles à l'homme via l'alimentation ou l'environnement. La problématique du projet de recherche est représentée dans la figure 29 et les dangers abordés dans cette thèse sont également mis en évidence (encadrés).

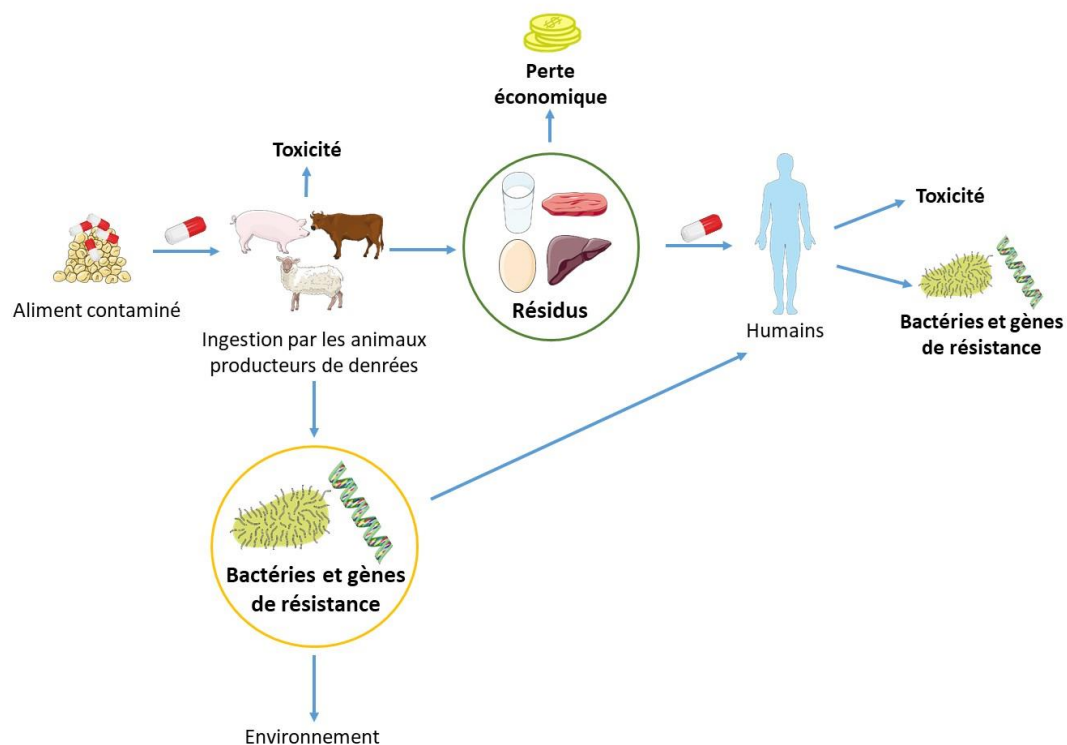


Figure 29. Problématique de recherche du projet. Encadrés en jaune et en vert, deux dangers conduisant à deux risques*

La problématique de ce projet de thèse est, donc :

Quels sont les risques pour l'homme générés par des aliments pour animaux producteurs de denrées alimentaires contaminés par des antibiotiques à des taux acceptés dans le cadre réglementaire actuel?

Les sous questions de recherches sont :

Est-ce que l'exposition des animaux à un aliment contaminé en dessous du seuil de conformité actuel peut conduire à la présence de résidus au-dessus de la LMR ?

Est-ce que l'exposition des animaux à un aliment contaminé en dessous du seuil de conformité actuel peut contribuer à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques ?

Pour répondre à ces 2 questions, nous nous proposons d'étudier, plus précisément chez le porc, l'effet de ces expositions à plusieurs antibiotiques (amoxicilline, oxytétracycline, sulfadiméthoxine et triméthoprim) mis en évidence dans les plans de surveillance. Pour y parvenir, trois phases de travaux ont été planifiées.

I. Développement et validation de méthodes analytiques pour le dosage d'antibiotiques dans les tissus et matrices biologiques de porc et application à une étude pilote

Afin de quantifier les résidus d'antibiotiques dans les différentes matrices de porc, des méthodes analytiques LC-MS/MS ont été développées et validées. Les antibiotiques de choix ont été l'amoxicilline (AMOX), l'oxytétracycline (OTC), la sulfadiméthoxine (SDMT) et le triméthoprim (TMP). Cette sélection a été faite selon deux critères : les antibiotiques les plus utilisés sous forme de prémélange chez les porcs et les antibiotiques les plus retrouvés lors des plans de surveillance français de 2017 et 2018 portant sur des aliments prélevés à la ferme. Les matrices de porc étudiées sont le plasma, les fèces, le muscle, le foie et le rein, afin de documenter la pharmacocinétique plasmatique et tissulaire de ces antibiotiques et leur concentration au niveau intestinal. Les méthodes ont été validées selon l'approche du profil d'exactitude et ensuite appliquées dans le cadre d'une étude pilote. Dans cette étude, trois groupes de deux porcs ont reçu un aliment contaminé par les antibiotiques de choix : amoxicilline, oxytétracycline ou l'association sulfadiméthoxine/triméthoprim. La validation

des méthodes analytiques et leurs applications lors de l'étude animale pilote ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Food Additives and Contaminants. Part A*.

II. Evaluation du risque de présence de résidus dans les denrées d'origine animale suite à une exposition dans la limite des seuils réglementaires

Le deuxième objectif de la thèse était d'évaluer le risque de présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale suite à l'exposition à un aliment contaminé. Pour cela, deux expérimentations animales ont été réalisées. Dans chaque étude, des porcs ont reçu, par le biais d'aliments supplémentés, soit l'oxytétracycline, soit l'association sulfadiméthoxine/triméthoprimine à des concentrations correspondant aux taux de contamination croisée tolérés par les bonnes pratiques de fabrication. Des échantillons de plasma, fèces, foie, muscle et rein ont été prélevés et analysés par LC-MS/MS avec les méthodes développées. Le risque de dépassement des LMR dans les différents tissus a été évalué. De plus, pour la sulfadiméthoxine, une recherche de métabolites dans le foie a été réalisée. Finalement, un modèle pharmacocinétique a été développé afin de prédire, selon le taux de contamination de sulfadiméthoxine dans l'aliment, la concentration d'antibiotique attendue dans les tissus. L'étude animale concernant l'association sulfadiméthoxine/triméthoprimine a fait objet d'une publication qui a été soumise au journal *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

III. Evaluation du risque de sélection d'antibiorésistance chez les animaux exposés à un aliment contaminé dans la limite des seuils réglementaires

Le dernier objectif de la thèse était d'évaluer l'impact de la contamination croisée des aliments sur le risque de sélection de bactéries résistantes dans le microbiote intestinal. Pour répondre à cette question, une étude animale a été faite sur deux groupes de porcs : un groupe contrôle et un autre recevant un aliment contaminé par l'oxytétracycline. Des échantillons fécaux ont été prélevés avant et pendant le traitement et des analyses microbiologiques ont été effectuées afin d'étudier l'évolution de populations de *E. coli* résistantes dans les deux groupes au cours du temps. Des tests de sensibilité à d'autres antibiotiques ont également été faits afin d'identifier des possibles co-résistances, et les groupes phylogénétiques des souches isolées ont été caractérisés afin d'étudier la diversité clonale des isolats. Cette étude a fait l'objet d'un article qui a été soumis au *Journal Veterinary Microbiology*.

III- Méthodes mises en œuvre

1. Outils pour mesurer les risques chimiques liés aux résidus d'antibiotiques dans les aliments pour animaux

1.1. Analyse pharmacocinétique

La pharmacocinétique étudie le devenir des médicaments dans l'organisme. Connaître le comportement des principes actifs dans les organismes est essentiel pour l'évaluation de risques liés aux résidus dans les denrées d'origine animale, ainsi que pour la fixation des doses posologiques et des LMR. Il y a quatre phases dans le transit du médicament dans l'organisme : absorption, distribution, métabolisation et excrétion (ADME).

- Absorption : passage du principe actif du site d'administration à la circulation sanguine. Cette phase n'est pas présente dans le cas d'une administration intravasculaire. On la caractérise par la biodisponibilité (fraction de la dose administrée, absorbée par l'organisme) et par la vitesse de cette absorption.
- Distribution : diffusion et répartition du principe actif dans l'organisme et les différents tissus.
- Métabolisation : également appelée biotransformation, c'est l'altération de la structure chimique du médicament pour produire des métabolites (actifs ou inactifs) qui seront éliminés par excrétion.
- Excrétion : excrétion du principe actif ou de ses métabolites de l'organisme. Elle est principalement rénale, dans l'urine ou biliaire, dans les fèces.

L'élimination d'une substance de l'organisme résulte des processus de métabolisation et d'excrétion.

Pour l'étude du comportement du médicament, deux types d'approches pharmacocinétiques sont possibles, l'analyse non compartimentale et l'analyse compartimentale.

1.1.1. Analyse non compartimentale

L'analyse non compartimentale ou NCA (pour *Non-Compartmental Analysis*) ne fait pas l'hypothèse des compartiments. Avec cette approche, il n'y a pas de création d'un modèle mathématique, mais une estimation des paramètres pharmacocinétiques grâce aux données expérimentales. Les principaux paramètres sont :

- Aire sous la courbe (AUC, *Area Under the Curve*) : ce paramètre représente l'exposition de l'organisme au médicament.
- Cmax et Tmax : concentration maximale de principe actif dans une matrice et temps nécessaire pour atteindre cette concentration après administration.
- Temps moyen de résidence (MRT, *Mean Residence Time*) : temps moyen passé par la molécule dans l'organisme (de son entrée à sa sortie).
- Temps de demi-vie terminal : temps nécessaire pour diviser par deux la concentration plasmatique du médicament au cours d'une phase de pseudo-équilibre.
- Volume de distribution : volume théorique (apparent) dans lequel le médicament se distribue. Ce n'est pas un volume réel.
- Clairance : volume totalement épuré (à concentration constante) de cette substance par unité de temps qui représente la capacité de l'organisme à éliminer le médicament

1.1.2. Analyse compartimentale

Ce type d'approche représente mathématiquement l'organisme sous la forme de compartiments dans lesquels le médicament se déplace et se répartit. Les compartiments sont des espaces virtuels qui peuvent représenter une réalité biologique ou anatomique (comme le fluide sanguin, par exemple), ou être fictifs et ne pas représenter un tissu particulier mais un tissu ou plusieurs. Dans chaque compartiment le principe actif a un comportement similaire d'un point de vue cinétique. C'est pour cela que, dans un modèle monocompartimental (le plus simple), le médicament aura une cinétique homogène dans l'ensemble de l'organisme ; alors que dans les modèles à plusieurs compartiments le principe actif sera distribué entre eux avec une cinétique différente dans chacun d'eux. Chaque compartiment aura un volume de distribution. Le modèle comprend des constantes d'échanges entre les compartiments et des constantes d'entrée (constante d'absorption pour

les administrations extravasculaires) et de sortie (constante d'élimination). Ces paramètres, ainsi que la dose administrée, détermineront la variation au cours du temps de la concentration du principe actif dans le compartiment (figure 30). L'analyse compartimentale consistera à sélectionner un modèle mathématique le plus simple possible capable de décrire les données expérimentales. La modélisation permettra également de simuler les concentrations dans les différents compartiments en fonction des protocoles de traitement (doses et échéances) des animaux.

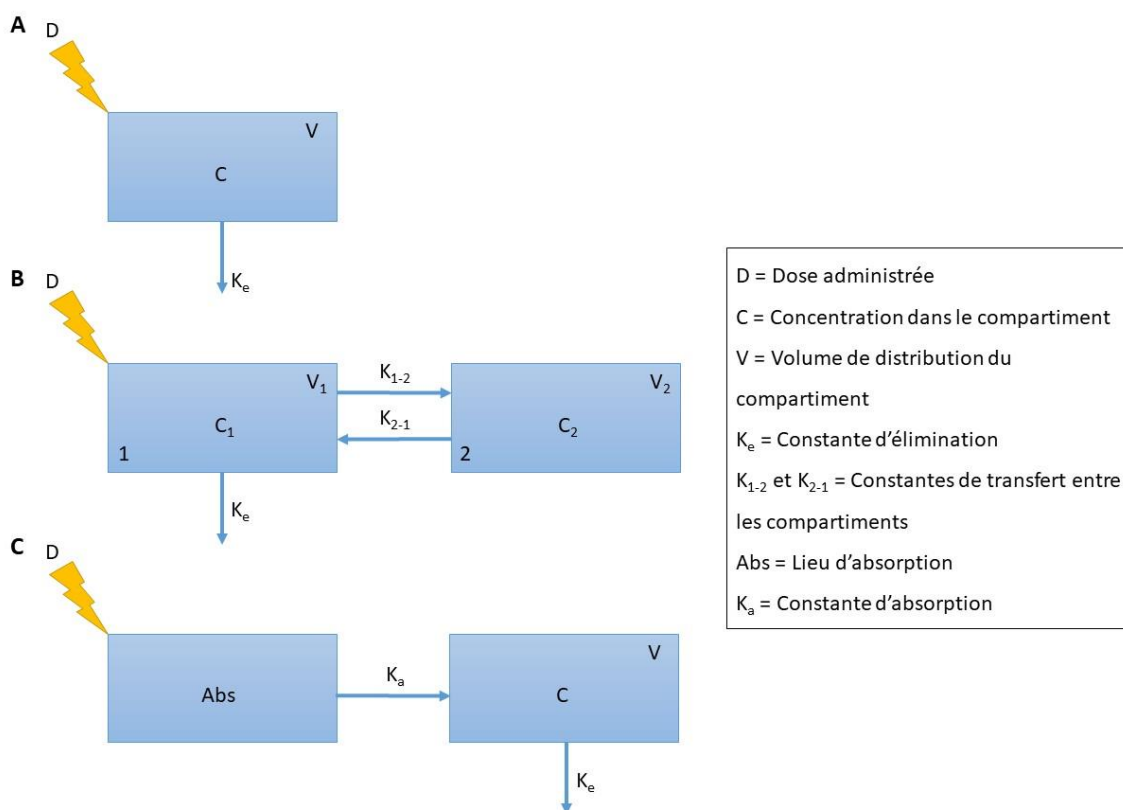


Figure 30. Représentation d'un modèle monocompartimental (A), bicompartimental (B) et monocompartimental avec administration extravasculaire (C)

Dans le cadre de cette thèse, une analyse compartimentale basée sur une analyse pharmacocinétique de population (PKPop) a été réalisée. Ce type d'analyse est souvent utilisé quand les données disponibles sont limitées. La PKPop prend en compte toutes les données de façon simultanée, au lieu de réaliser une analyse individu par individu. Elle a pour objectif de décrire le comportement d'un médicament dans l'organisme ainsi que d'estimer et d'expliquer la variabilité (interindividuelle, inter-occasion...) avec des covariables (poids, âge...), afin de pouvoir appliquer le modèle à une population plus grande. Le développement

d'un modèle en PKPop commence par la sélection d'un modèle structurel (monocompartimental, bicompartimental, etc.) et d'un modèle d'erreur. Ensuite, dans un deuxième temps, les covariables sont rajoutées au modèle [109, 110].

1.2. Méthodes analytiques de dosage des résidus d'antibiotiques et des métabolites dans les matrices biologiques

La détection et le dosage des résidus d'antibiotiques et des métabolites dans les tissus et matrices biologiques nécessitent une première étape de préparation d'échantillon. Les extraits purifiés sont ensuite injectés dans un appareil analytique constitué d'un système de séparation des analytes (chromatographie) couplé à un système de détection (ultraviolet, fluorescence ou spectrométrie de masse).

1.2.1. Techniques de préparation des échantillons

Quelle que soit la technique de détection utilisée et l'objectif de l'analyse, une phase préliminaire d'extraction de l'analyte et de ses métabolites, suivie éventuellement d'une purification, est nécessaire. Cette étape de préparation d'échantillon nécessite une phase d'optimisation pour améliorer le rendement d'extraction et la robustesse de la procédure de préparation. Dans le cadre d'un dosage de résidus, la connaissance des composés recherchés permet d'appliquer une méthode d'extraction-purification plus sélective afin de limiter les effets matrices. Les techniques les plus utilisées pour l'extraction d'antibiotiques sont l'extraction liquide-liquide (LLE) ou solide-liquide (SLE) et l'extraction en phase solide (SPE). La LLE et la SLE sont des procédures rapides et simples qui utilisent des solvants organiques plus ou moins polaires (méthanol, acétonitrile, acétate d'éthyle), ou des solutions aqueuses tamponnées pour extraire les antibiotiques de leur matrice. Le choix du solvant d'extraction dépendra des caractéristiques physicochimiques de l'analyte. D'un autre côté, la SPE permet une purification des échantillons ainsi qu'une concentration des molécules avec l'utilisation de cartouches sur lesquelles les analytes d'intérêt restent retenus, on parle alors de SPE rétentive. Ensuite, une ou plusieurs étapes de lavage sont réalisées afin d'enlever les possibles interférents, pour finalement faire éluer les molécules. La SPE peut être également utilisée de manière non-rétentive selon un mode appelé « pass-through ». Dans ce cas, l'extrait est déposé sur la cartouche dans un solvant permettant d'éluer directement l'analyte mais de

retenir certaines interférences (i.e. phospholipides). D'autres techniques, comme les méthodes QuEChERS (pour *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* ou rapide, facile, abordable, efficace, robuste et sûr) reposent sur une extraction de type LLE ou SLE, avec ajout de sels comme le chlorure de sodium ou le sulfate de magnésium (on parle alors de salting-out) et/ou de phase solide dispersive (dSPE) pour purifier les échantillons. Les différents sels et la phase solide dispersive sont préalablement pesés, ce qui apporte de la robustesse au procédé.

Parfois, une étape d'évaporation suivie de la reconstitution dans un solvant compatible avec la séparation chromatographique est effectuée pour concentrer les analytes. Cette étape permet également une dilution de l'extrait dans un solvant compatible avec la phase mobile chromatographique.

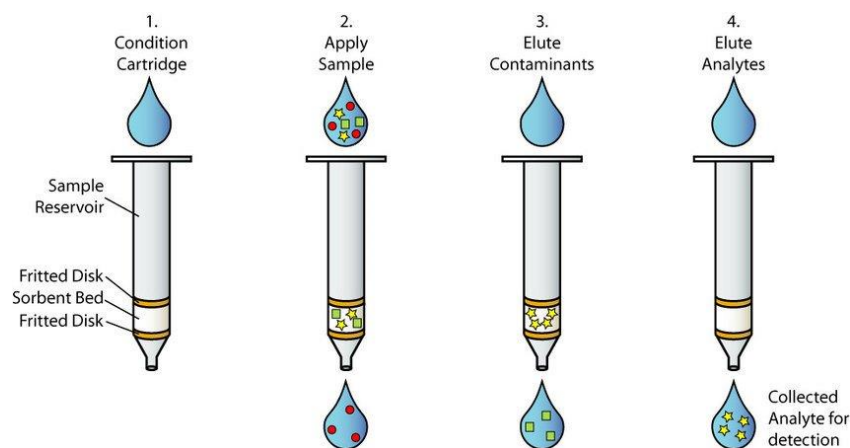


Figure 31. Principe et étapes de la SPE : conditionnement de la cartouche, dépose de l'échantillon, lavage pour éliminer les interférents et élution des analytes d'intérêt [111]

1.2.2. Technique de séparation d'analytes : la chromatographie liquide

La chromatographie est la technique de séparation d'analytes la plus utilisée. Plusieurs techniques de séparation différentes sont possibles et sont toutes basées sur deux éléments principaux : une phase stationnaire et une phase mobile. La phase mobile (PM), qui peut être liquide ou gazeuse, transporte les analytes de l'échantillon. Ces derniers interagissent avec la phase stationnaire (PS) liquide ou solide, et, en fonction de leur affinité avec cette PS, seront plus ou moins retenus et donc séparés. En fonction de la phase mobile utilisée on peut diviser les techniques chromatographiques en chromatographie liquide (*liquid chromatography*, LC) ou chromatographie gazeuse (*gas chromatography*, GC). La GC est principalement utilisée

pour des analytes facilement volatiles, ce qui n'est pas le cas de la plupart des antibiotiques. La LC sera donc la technique privilégiée pour la séparation d'antibiotiques dans un échantillon. Le choix de la phase stationnaire (colonne analytique), de la phase mobile et du mode d'élution est essentiel pour obtenir une séparation et une résolution suffisante des analytes.

Dans le cas d'une chromatographie en phase normale, la PS est polaire (gel de silice) et la PM est apolaire en début de gradient. Pour la chromatographie en phase inverse ce sera l'opposé, la PS sera apolaire (silice greffée avec groupements apolaires) et la PM polaire en début de gradient. Dans la plupart des cas, la chromatographie en phase inverse est la technique de choix pour la quantification d'antibiotiques, avec des colonnes de type C18 [112-118] ou de type phényle [60, 119, 120]. Dans le cas des aminoglycosides, qui sont des molécules très polaires, des colonnes de type HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography* ou chromatographie liquide à interaction hydrophile) sont également utilisées [121].

La PM, dans le cas d'une chromatographie en phase inverse, sera polaire en début de gradient. Pour l'analyse d'antibiotiques, il est fréquent d'utiliser une PM binaire avec des solvants comme l'eau, l'acétonitrile ou le méthanol [60, 118, 121-127]. L'ajout d'une solution tampon pour maintenir le pH, ou d'un acide pour favoriser l'ionisation en spectrométrie de masse, peuvent être également utiles. La proportion des solvants dans la PM peut être constante au cours du temps (élution isocratique) ou peut varier pendant le temps d'analyse (élution en gradient). L'élution en gradient permet, en général, une meilleure résolution et finesse des pics et accélère l'élution lorsque les analytes ont des polarités assez différentes.

1.2.3. Technique de détection pour le dosage d'antibiotiques : la spectrométrie de masse en tandem

Plusieurs techniques de détection peuvent être utilisées telles que le détecteur ultraviolet (UV), la fluorescence ou la spectrométrie de masse (MS pour *mass spectrometry*). La détection UV est basée sur l'absorbance des molécules à une certaine longueur d'onde. La fluorescence est basée sur la capacité de certaines molécules à émettre une fluorescence après excitation par un rayonnement à une longueur d'onde adaptée. Dans le cas d'un triple quadripôle c'est la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) qui est utilisée.

La MS/MS est devenue la technique la plus utilisée pour l'identification et la quantification d'antibiotiques. En effet, il s'agit d'une technique analytique offrant une sensibilité et une spécificité de détection élevée et les différents types de source permettent de couvrir une large gamme de composés. Le principe de la détection par MS est basé sur une transformation des analytes en ions au niveau de la source, puis d'une séparation des ions au niveau de l'analyseur en fonction des rapports m/z (m = masse, z = charge), et enfin d'une conversion des courants ioniques en courant électrique permettant la détection des composés.

La source d'ionisation volatilise et ionise les molécules. L'ionisation peut se produire par protonation ou déprotonation, par perte ou capture d'un électron, ou par formation d'un adduit. Plusieurs sources, basées sur des principes différents, existent. Une des plus utilisées en couplage avec la chromatographie liquide car adaptée pour une large gamme de petites molécules non volatiles, comme les antibiotiques, est la source d'ionisation par electrospray (ESI). Le principe de l'ESI repose sur un échantillon liquide qui passe à travers un capillaire, dans lequel des fines gouttelettes chargées vont se former grâce à un champ électrique. Avec l'application de chaleur et d'un gaz (azote, air comprimé), le solvant s'évapore et la taille des gouttelettes se réduit. Par conséquent, la densité de charge de la surface des gouttelettes augmente, ce qui entraîne leur désintégration et l'éjection des ions, qui sont conduits vers l'analyseur de masse. Une autre source d'ionisation qui a été développée récemment est la source Unispray (US) dont le principe est proche de celui de la source ESI mais met en jeu un spray accéléré entrant en interaction avec une aiguille cylindrique chargée et utilisant l'effet Coanda⁶. Cependant, la source US permet une plus grande désolvatation et fission des gouttelettes, ce qui entraîne la production d'un plus grand nombre d'ions et un meilleur rendement d'ionisation.

⁶ Effet Coanda : phénomène physique pour lequel un fluide gazeux ou liquide est attiré par une surface courbe sur laquelle il coule.

III- Méthodes mises en œuvre

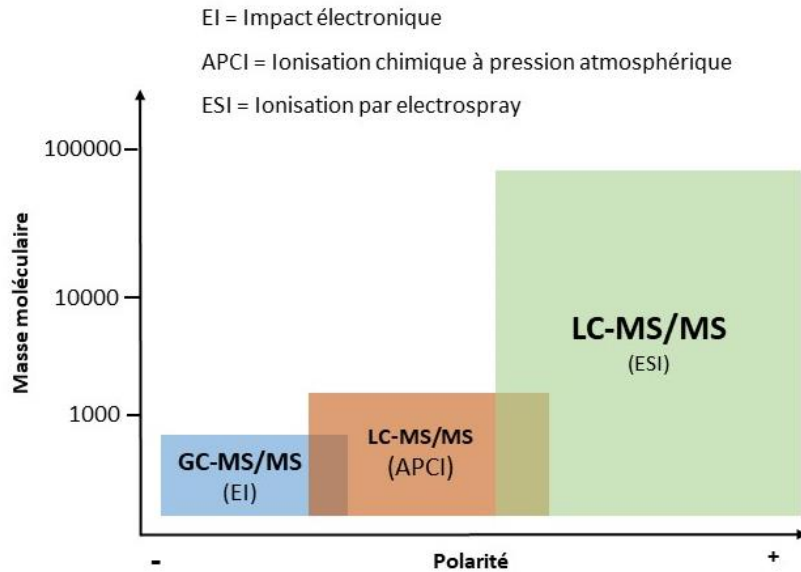


Figure 32. Types de techniques et de sources d'ionisation en fonction de la polarité et la taille des analytes (d'après [128-130])

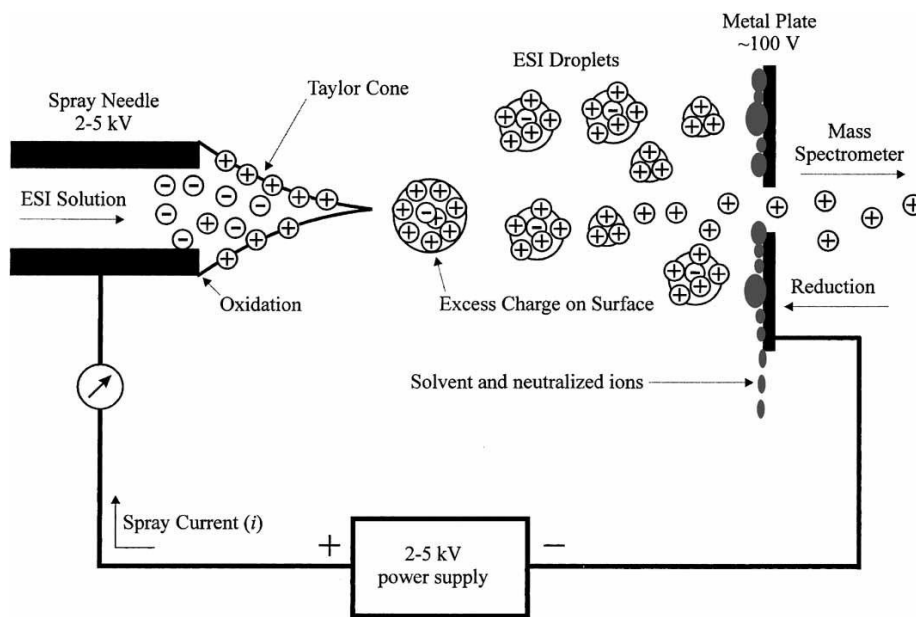


Figure 33. Représentation de la source electrospray [131]

L'analyseur de masse, ici le triple quadripôle (TQ) sépare les ions en fonction de leur rapport m/z . Un quadripôle est constitué de quatre barres métalliques connectées deux à deux électriquement à travers lesquelles les ions voyagent. Un balayage des tensions appliquées aux électrodes permettra d'observer successivement l'ensemble des ions. Plusieurs modes d'acquisition sont possibles mais le *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) est un des plus utilisés car il permet une détection spécifique et augmente la sensibilité. Le MRM permet de sélectionner plusieurs ions parents et plusieurs ions fragments afin de détecter et quantifier

un grand nombre de molécules en même temps. C'est ce type d'appareil qui a été choisi pour effectuer les dosages nécessaires lors des différentes phases animales réalisées dans le cadre de cette thèse. Dans le premier quadripôle (Q1), les ions parents d'intérêt sont sélectionnés par rapport à leur ratio m/z . Ces ions continuent jusqu'au deuxième quadripôle (Q2), qui est une cellule de collision contenant un gaz inerte dans laquelle les ions parents vont se fragmenter et donner des ions fragments ou ions produits. Les ions produits vont jusqu'au troisième quadripôle (Q3) où, comme dans le Q1, ils seront sélectionnés selon leur m/z . Ces ions atteignent finalement le détecteur, au niveau duquel le courant ionique sera transformé en courant électrique et le signal enregistré.

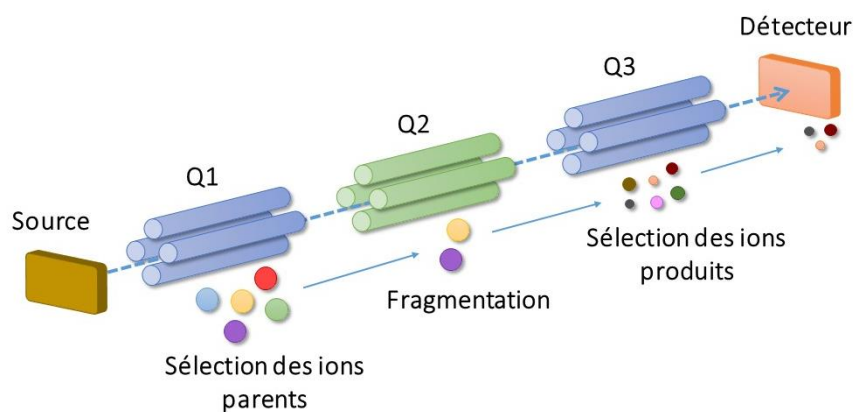


Figure 34. Représentation d'un triple quadripôle

Sur un système de type TQ, l'optimisation des conditions de détection en MS est réalisée par infusion de l'ensemble des analytes pour déterminer les transitions ainsi que les paramètres de source « composés dépendants » les plus pertinents (tension de cône, énergie de collision CE). Ensuite, les paramètres de source comme les gaz de nébulisation, de séchage, rideaux et la température de source et de capillaire, communs pour l'ensemble des analytes, sont optimisés. On choisit généralement les paramètres les plus favorables au composé le plus difficile à ioniser.

Une méthode d'analyse dite quantitative est basée sur la comparaison de la réponse de l'analyte dans un échantillon à une gamme de dosage établie préalablement ou en parallèle. Cette gamme couvrira le domaine de mesure visé par la méthode et est construite en supplémentant la matrice avec l'analyte à des concentrations connues. En général, un standard interne est également rajouté en début de procédure afin de corriger les rendements

d'extraction et les effets matrice fréquents avec les sources ESI. Le ratio du signal analyte/standard interne est utilisé pour la quantification.

1.3. Validation des méthodes de dosage des antibiotiques

La validation est une des étapes les plus importantes avant l'application en routine d'une méthode analytique. Le terme validation est défini dans la norme ISO 17025 [132] comme « *la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une application prévue déterminée sont remplies* », c'est-à-dire, la démonstration que la méthode analytique répond aux besoins de l'usage prévu. Il existe différents documents référentiels pour la validation des méthodes analytiques et les critères d'acceptabilité des caractéristiques de performance dépendent de ces référentiels. Dans le cadre des contrôles officiels pour le dépistage et le dosage de résidus d'antibiotiques, les exigences concernant les méthodes d'analyse, l'interprétation des résultats et le mode d'échantillonnage sont définis dans le règlement d'exécution 2021/808 [39], qui a récemment remplacé l'ancienne décision 2002/657/CE.

D'une manière générale, les caractéristiques de performance à évaluer dans une méthode, ainsi que leurs définitions sont présentées dans le tableau 6 :

Caractéristique de performance	Définition
Spécificité	Capacité d'établir de manière univoque que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser
Sensibilité	Capacité de la méthode à donner une réponse positive quand la cible est présente
Fonction d'étalonnage	Relation entre la variable Y (signal) et la variable X (quantité d'analyte)
Fidélité	Etroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites
Fidélité intermédiaire	Variabilité intra-laboratoire (inter-séries)
Répétabilité	Variabilité intra-série (même jour, même opérateur, mêmes conditions opératoires)
Justesse	Etroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée
Exactitude	Etroitesse de l'accord entre le résultat et la valeur de référence acceptée
Limite de détection	Plus faible concentration dans un échantillon qui puisse être détectée, mais non quantifiée
Limite de quantification	Plus faible concentration dans un échantillon qui puisse être quantifiée avec une fidélité et une justesse acceptables dans des conditions expérimentales indiquées

Tableau 6. Caractéristiques d'une méthode analytique (d'après [133])

Deux approches sont possibles pour l'évaluation des critères de performance d'une méthode : l'approche caractéristique par caractéristique et l'approche globale. La première vise à traiter chaque critère de façon indépendante (justesse, fidélité, limites de quantification et détection, etc.). Cette approche est souvent utilisée lors des contrôles officiels. La seconde, l'approche globale, évalue une seule caractéristique et la validation de la méthode repose sur un

intervalle d'acceptabilité. La caractéristique à évaluer est l'exactitude, qui englobe à la fois la justesse et la fidélité.

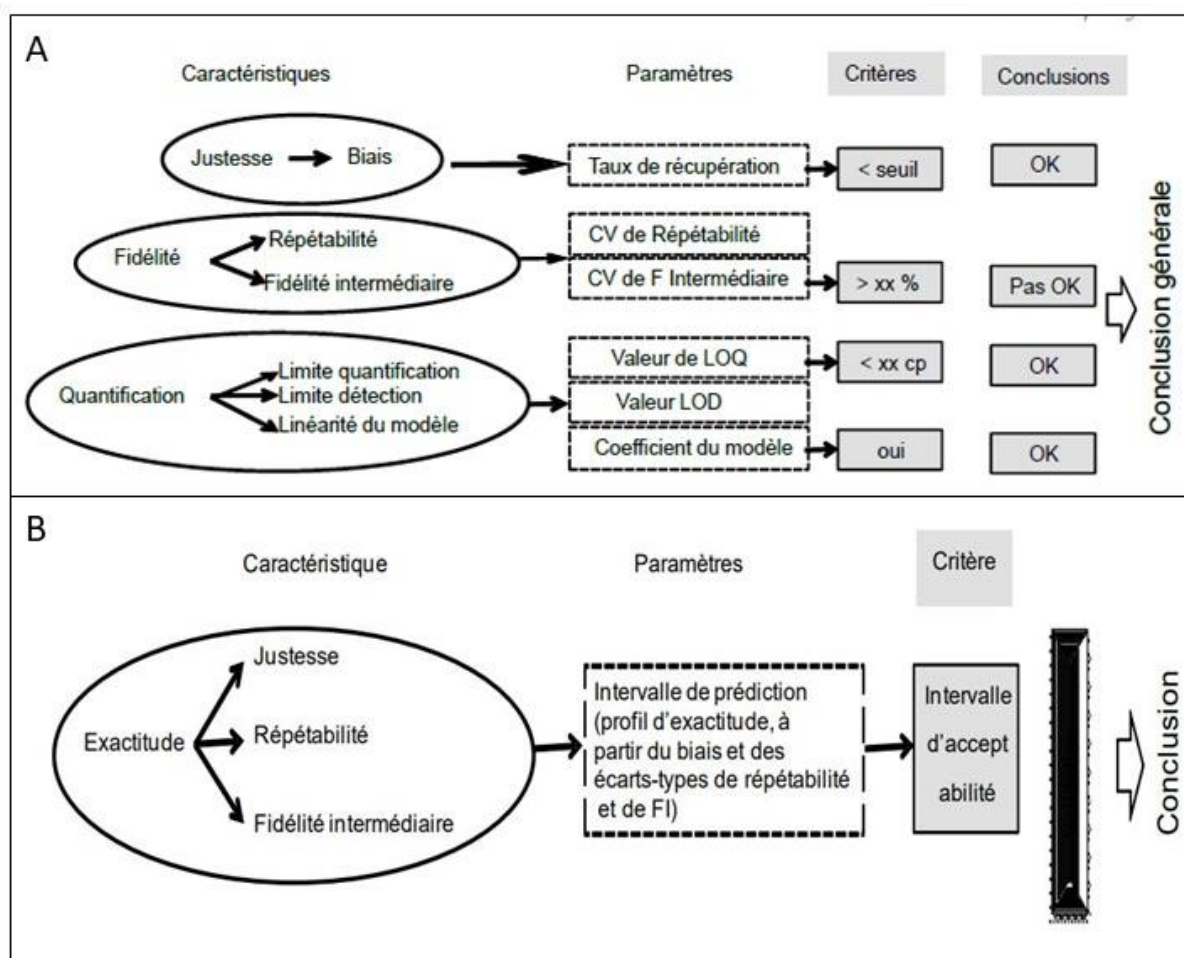


Figure 35. Approche caractéristique par caractéristique (A) et approche globale (B) pour la caractérisation d'une méthode analytique [133]

Comme défini dans le tableau 6, la fidélité est « l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus dans des conditions déterminées » [39]. La justesse est définie comme « l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée » [39]. Par conséquent, l'exactitude sera « l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence vraie acceptée » [39]. L'exactitude représente donc l'erreur totale et elle est déterminée par la justesse (erreur systématique) et la fidélité (erreur aléatoire ou biais).

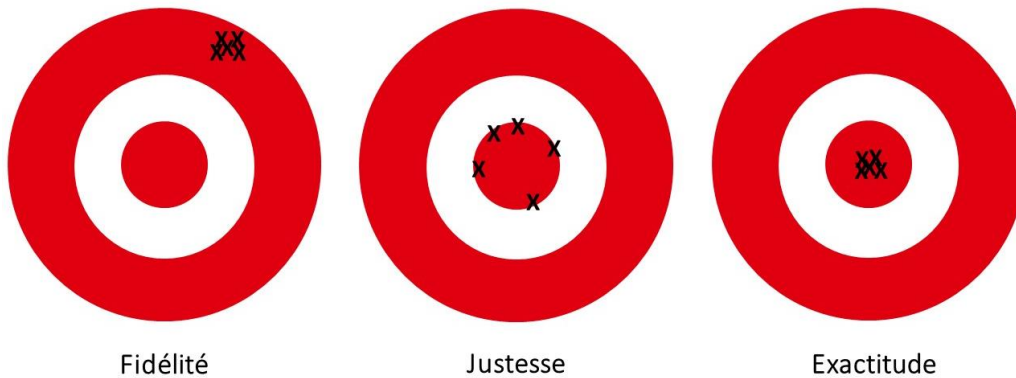


Figure 36. Fidélité, justesse et exactitude

Pour cette approche globale, l'outil statistique du profil d'exactitude (PE) est souvent utilisé [134-137]. Il s'agit d'un outil graphique de décision qui permet, en évaluant l'exactitude d'une méthode, de déterminer si celle-ci est valide ou pas. Pour la construction d'un profil d'exactitude, des limites d'acceptabilité $\pm\lambda$ sont fixées, correspondant aux limites d'exactitude de la méthode. Un intervalle de tolérance β est défini, dans lequel une grande partie des futurs résultats se trouveront. Si cet intervalle β se trouve dans les limites $\pm\lambda$, la méthode peut être validée sur l'ensemble du domaine de dosage.

Pour réaliser la validation, deux types de standards sont préparés en supplémentant la matrice d'intérêt à des concentrations connues : les standards de calibration ou d'étalonnage (SE) et les standards de validation (SV). Les SE permettent de construire une courbe de calibration. Plusieurs méthodes mathématiques de régression sont possibles pour la construction de la fonction réponse (linéaire, linéaire pondéré, quadratique, quadratique pondéré...). Les SV, qui simulent les futurs échantillons à doser, permettent de déterminer les paramètres de performance de la méthode pour chaque niveau de concentration. Pour chaque modèle de régression un profil d'exactitude est construit et un indice d'exactitude est calculé en tenant compte de la fidélité et de la justesse. Un indice d'intervalle de dosage est également calculé, qui représente la gamme pour laquelle la méthode est valide, établissant donc les limites de quantification de la méthode (*lower limit of quantification*, LLOQ, et *upper limit of quantification*, ULOQ). Ces limites correspondent à l'intersection entre l'intervalle de tolérance β et les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$. Dans le cas où il n'y a pas d'intersection, les limites correspondront au plus petit et au plus grand niveau de concentration des SV. Le PE retenu sera celui avec les indices les plus proches de 1.

La figure 37 est la représentation d'un profil d'exactitude. La ligne rouge représente le biais relatif, qui représente la déviation de la concentration moyenne des SV calculée par le modèle par rapport à la vraie valeur. Les lignes discontinues bleues déterminent l'intervalle de tolérance β (fixé ici à 80%, donc au maximum 20% des futurs résultats seront en dehors de cet intervalle) et les noires les limites d'acceptabilité $\pm\lambda$ (20% pour le premier niveau et 15% pour le reste). Les points correspondent aux SV pour chaque concentration et chaque série

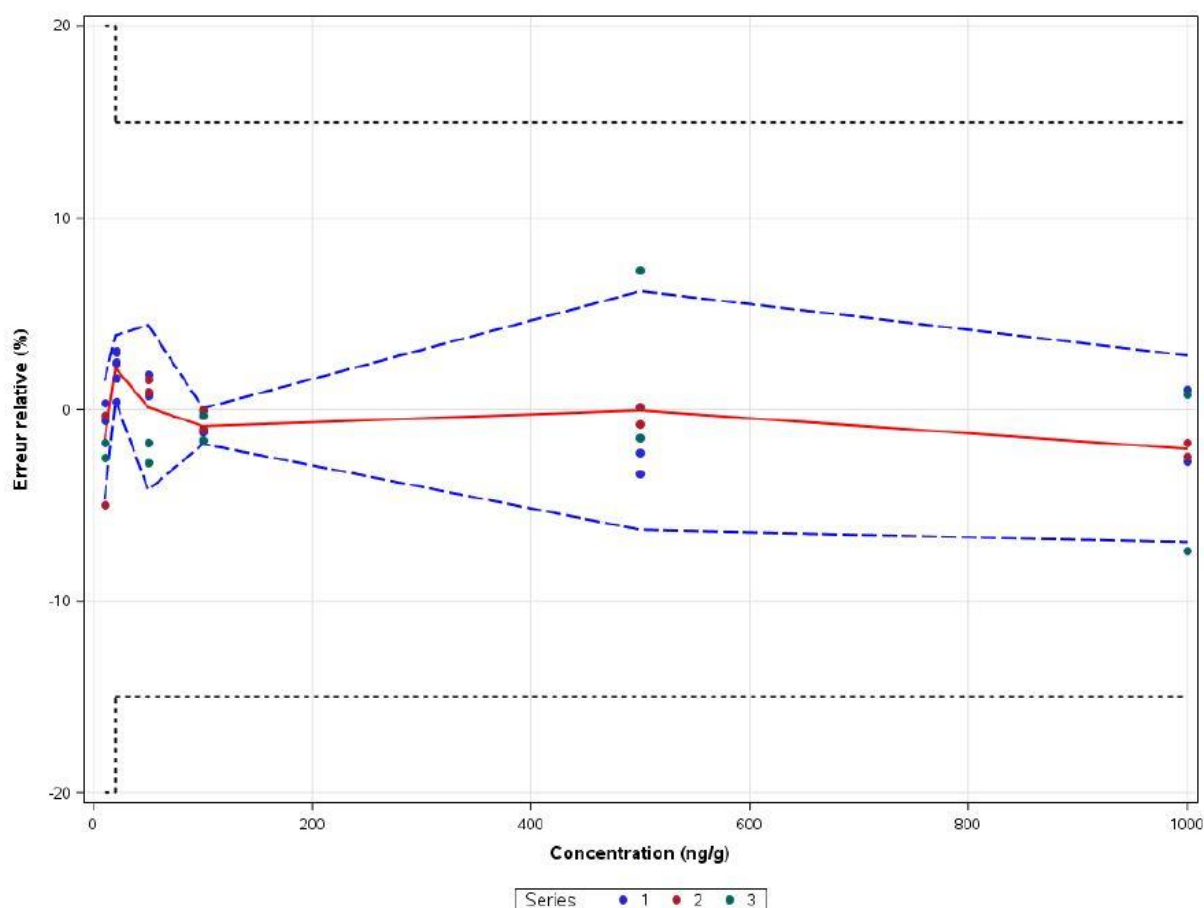


Figure 37. Représentation d'un profil d'exactitude

1.4. Recherche de métabolites par spectrométrie de masse à haute résolution : analyses ciblée et non ciblée

En spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS, *High Resolution Mass Spectrometry*), les sources utilisées sont les mêmes que celles utilisées en LC-MS/MS. Deux types d'analyseurs sont possibles pour la haute résolution : la technologie Orbitrap et le temps de vol. L'analyseur temps de vol (*time of flight*, ToF), celui qui a été utilisé pendant cette thèse, est constitué d'un

tube de vol dans lequel les ions, accélérés par un champ électrique, se déplacent. Leur rapport m/z sera calculé en fonction du temps nécessaire à l'ion pour parcourir le tube. Les ions les plus légers arriveront en premier au détecteur et les plus lourds en dernier. Ce type d'analyseur permet une vitesse d'acquisition très rapide associée à une haute résolution en masse. Un des avantages du ToF c'est la possibilité d'utiliser le mode d'acquisition *full scan*, grâce auquel nous allons pouvoir détecter l'ensemble des ions, sans aucune sélection, avec une précision en masse élevée. Ceci est important pour l'analyse non ciblée, car nous allons pouvoir étudier un large spectre de molécules, avec la possibilité de rechercher des composés à posteriori. L'optimisation à priori de la méthode pour chaque composé n'est pas nécessaire. Une optimisation dite « générique » et permettant de couvrir un maximum de composés sera utilisée.

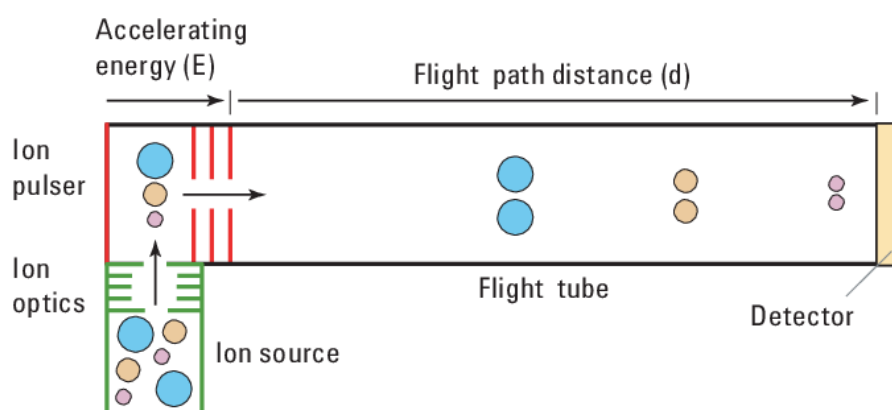


Figure 38. Représentation d'un ToF [138]

La HRMS est utilisée dans le domaine de la métabolomique pour l'identification de métabolites et de biomarqueurs de façon ciblée ou non ciblée. La HRMS peut également être utilisée pour le dosage de composés mais cette approche ne sera pas décrite ici puisqu'elle a été abordée précédemment avec le système de type TQ.

1.4.1. Analyse ciblée

L'analyse ciblée par HRMS à partir d'une acquisition en mode *full scan*, ne nécessite pas dans un premier temps l'utilisation d'un standard, ni d'optimiser les conditions de source comme sur un TQ. Les systèmes HRMS, comme le Vion IMS Qtof, permettent une recherche ciblée de métabolites à partir d'une liste pré-établie de composés à rechercher. Cette liste est basée sur des critères caractéristiques du composé comme la masse exacte avec une tolérance de 5

ppm, associé au temps de rétention lorsqu'il est connu. D'autres caractéristiques comme le profil isotopique ou certains fragments, si des modes de fragmentation sont associés, peuvent être utilisés. Ceci est très utile pour la recherche de xénobiotiques, tels que les métabolites issus de la biotransformation des antibiotiques dans l'organisme, par exemple. Les logiciels permettant de rechercher les métabolites de xénobiotiques existent et sont basés sur la connaissance des différences de masse associées aux différents types de transformations métaboliques (de phase I ou II). Il s'agit d'une analyse qualitative, et non quantitative. Dans ce type d'approche, une vérification de l'identité du composé est nécessaire dans un deuxième temps avec différents degrés de confiance [139]. Mais l'identification sûre du composé nécessitera la comparaison avec un standard analytique.

Ce type d'analyse ciblée utilisant la HRMS est parfois appelée « non-targeted data acquisition for target analysis » ou nDATA [140], ce qui résume parfaitement ce type d'approche.

1.4.2. Analyse non ciblée (approche « métabolomique »)

L'analyse non ciblée en HRMS est un outil souvent utilisé en métabolomique pour la recherche de biomarqueurs d'exposition ou de biomarqueurs d'effet. Les biomarqueurs d'exposition correspondent plutôt à des métabolites directs, tels que décrits dans le paragraphe précédent. Les biomarqueurs d'effet correspondent à des métabolites d'une voie métabolique qui auraient été impactés par un traitement ou une exposition. L'approche basée sur « l'empreinte métabolique » a pour principe la comparaison du profil métabolomique entre deux groupes (l'un exposé et l'autre non exposé, par exemple), afin d'identifier par discrimination des possibles biomarqueurs de différenciation.

Dans le cas d'une analyse non ciblée, la préparation des échantillons varie un peu par rapport à l'analyse ciblée. L'objectif ne sera pas d'extraire des molécules spécifiques mais d'extraire le maximum d'analytes possibles. Dans ce cas, au lieu d'adapter le protocole aux propriétés physico-chimiques d'une ou plusieurs molécules bien définies, des méthodes beaucoup plus génériques sont préférées. Dans ce type d'analyse il n'y aura pas systématiquement d'étape de purification car elle pourrait éliminer des métabolites d'intérêt. Parfois, plusieurs types de purification seront utilisés pour couvrir un maximum de métabolites polaires et apolaires.

Pour ce type d'analyse, il est préférable d'utiliser, lors de la chromatographie, des temps d'acquisition plus longs et des gradients d'élution complets afin de bien séparer tous les composés présents dans l'échantillon. De même, les échantillons doivent être injectés de façon aléatoire, et des injections régulières d'un échantillon dit « contrôle de qualité » (*quality control*, QC), qui est le résultat du mélange de tous les échantillons de la séquence, doivent être intercalées. Le suivi de la réponse du QC au cours du temps permet de tenir compte de la variation du signal de l'appareil au cours de la séquence et de la corriger, le signal pouvant diminuer énormément durant l'acquisition dû à l'encrassement de la source. Cette variation pourrait biaiser l'interprétation des résultats.

A. Traitement de données en métabolomique

Le traitement des données issues des analyses non ciblées pour l'étude métabolomique peut être réalisé grâce à différents logiciels et outils. La plateforme « Work4metabolomics » de Galaxy donne accès à un grand nombre d'outils permettant de retraiter des données acquises en LC-HRMS en vue d'une approche métabolomique. Ces outils, créés sous R, permettent de réaliser l'ensemble des étapes, du prétraitement des données brutes acquises en HRMS aux tests statistiques univariés et multivariés. Plusieurs étapes de prétraitement des données brutes sont réalisées :

- « Peak picking » : détection et extraction des pics dans chaque échantillon. Cette étape génère l'ensemble des signaux qui seront analysés par la suite et peut permettre de générer les EICs (Extracted Ion Chromatograms pour chaque m/z), ainsi que d'appliquer des filtres de bruit et d'établir la ligne de signal de base.
- « Grouping » : le groupement inter-échantillon permet de retrouver des pics identiques entre les différents échantillons (selon leur ratio m/z et leur temps de rétention).
- Alignement des pics : correction du temps de rétention (Tr). Cette étape permet d'aligner les Tr des signaux identiques afin de corriger les faibles décalages possibles dus à la dérive au cours de l'analyse. Un nouveau groupement peut être fait après cette étape pour identifier des éventuels nouveaux groupes qui n'étaient pas visibles avant la correction.

- « Fill peaks » : complétion de données manquantes, afin d'introduire du bruit dans les échantillons où aucun ion n'est détecté.
- L'annotation (fonction CAMERA) permet de regrouper les adduits, fragments et isotopes dans des « pc groups ». Cette fonction sert à identifier les pics qui proviennent de la même molécule.
- Normalisation par rapport au signal des QC et leur dérive au cours du temps d'acquisition. Après normalisation, un coefficient de variation (CV) est obtenu, qui correspond à la variation des réponses des ions dans les échantillons QC. Une valeur de CV maximale tolérée est définie et les variables pour lesquelles le CV est supérieur à cette valeur seront éliminés grâce à l'application d'un filtre.

A l'issue de ces étapes de prétraitement, des tests statistiques permettant de détecter les signaux discriminants pourront être appliqués.

B. Analyses statistiques en métabolomique

Suite au traitement des données brutes, deux types d'analyses statistiques sont possibles : les tests univariés et les tests multivariés. Les tests univariés sont des tests de t de Student qui analysent les variables une à une et permettent d'identifier celles pour lesquelles la différence dans la réponse entre les deux groupes est significative. Une correction liée à la multiplicité des variables est nécessaire. Les tests multivariés étudient l'ensemble des variables de façon simultanée. Ce type d'analyse synthétise les informations et permet de représenter l'ensemble du jeu de données et de visualiser sa distribution dans un espace à deux dimensions sous forme de « *score plot* », qui est défini par deux axes, appelés composantes. Ces composantes sont extraites pour décrire au mieux la variance des données et sont classées en fonction de la proportion de variabilité qu'elles expliquent. La première composante explique la plus grande source de variance ; la deuxième, qui est orthogonale à la première, explique la plus grande source de la variance restante. Le processus sera le même pour les composantes suivantes, si bien qu'avec les deux ou trois premières composantes, la plupart de la variance sera déjà expliquée et les dernières serviront pour expliquer uniquement le bruit de fond.

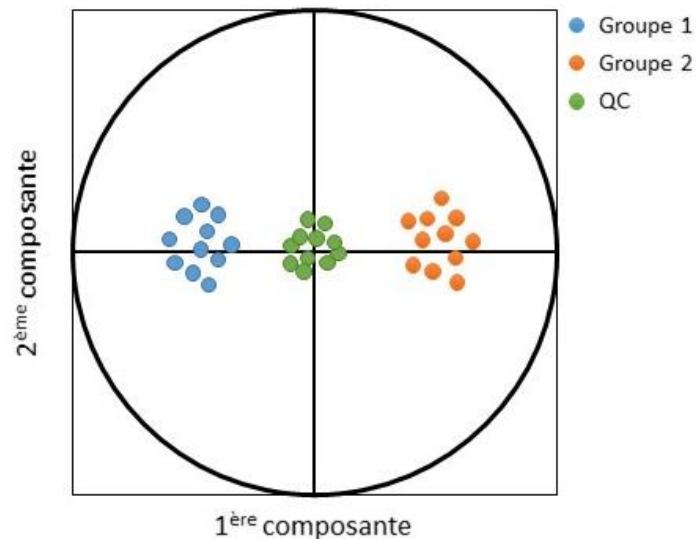


Figure 39. Score plot d'une analyse multivariée

Il existe deux types d'analyses multivariées :

- Analyses multivariées descriptives

Un des plus utilisés est l'Analyse en Composante Principale (ACP). L'ACP permet d'observer la répartition des échantillons sur les deux composantes, sans besoin d'un « a priori », c'est-à-dire de connaître l'appartenance à un groupe, et permet donc d'identifier une potentielle différente distribution entre les deux groupes, liée à leur nature. L'ACP permet également une représentation graphique des variables sur un « loadings plot ». La relation entre le « score plot » et le « loadings plot » peut parfois apporter les premiers éléments pour identifier les variables impliquées dans la différenciation.

- Analyses multivariées explicatives et prédictives

La régression des moindres carrés partiels ou PLS (*Partial Least Squares*) et l'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels ou PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) font partie de ce type d'analyse. Dans la première, les variables explicatives et expliquées sont de type numérique, pour la seconde, les variables à expliquer sont de type catégorielle (appartenance au groupe). Pour les analyses multivariées explicatives, une information préalable sur la nature des échantillons est nécessaire (appartenance au groupe). Les composantes seront extraites en tenant compte de cette information et un modèle statistique est construit, qui essaiera d'expliquer (et de prédire s'il est appliqué à des jeux de données futurs) la plus grande proportion de la variable Y

(appartenance à un groupe ou à un autre) possible à partir des variables X. La performance du modèle est estimée grâce à plusieurs critères diagnostiques : R2Y et Q2Y. R2Y est le pourcentage de la variable Y (appartenance à un groupe ou à l'autre) qui est expliqué par le modèle. Q2Y est le pouvoir prédictif du modèle. Néanmoins, la capacité prédictive du modèle doit être également évaluée avec des tests de permutation, qui permettent de savoir si le modèle est sur-ajusté. Ces tests consistent à permuter les valeurs de la variable Y tout en laissant les X. A chaque permutation, un nouveau modèle est construit et des nouveaux critères $R2Y_{perm}$ et $Q2Y_{perm}$ sont estimés, qui, pour que le modèle soit valide (et non sur-ajusté), doivent être moins bons que R2Y et Q2Y. Les valeurs $pQ2Y$ et $pR2Y$, qui représentent la proportion de $Q2Y_{perm}$ supérieure à Q2Y et de $R2Y_{perm}$ supérieure à R2Y, sont calculées et servent d'indicateurs de performance du modèle.

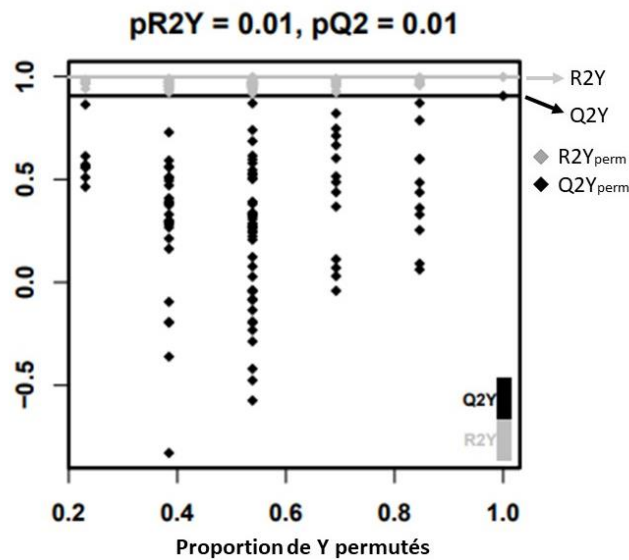


Figure 40. Représentation des tests de permutations. Les valeurs de $R2Y_{perm}$ et $Q2Y_{perm}$ doivent tomber en dessous de R2Y et Q2Y respectivement pour que le modèle soit acceptable

2. Outils pour mesurer les risques biologiques liés aux résidus d'antibiotiques dans les aliments pour animaux

2.1. Evolution des populations bactériennes

La surveillance de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries commensales isolées chez des animaux sains sélectionnés au hasard peut donner une représentation du réservoir de déterminants de la résistance présents dans les bactéries d'origine animale. Les bactéries commensales de l'intestin des animaux d'élevage comme *E. coli* sont considérées comme des vecteurs de gènes de résistance qui peuvent se propager horizontalement à des bactéries zoonotiques et à d'autres bactéries par le biais de la chaîne alimentaire [141, 142]. C'est également la bactérie commensale la plus abondante du tractus digestif de l'homme. Elle est considérée comme un bon indicateur de la pression sélective des antibiotiques exercée sur les populations bactériennes intestinales des animaux producteurs de denrées [143].

Deux démarches techniques sont possibles pour le suivi des populations bactériennes et de la résistance : les techniques phénotypiques et les techniques moléculaires.

2.1.1. Techniques phénotypiques

La recherche de *E. coli* comme indicateur bactérien dans les fèces des animaux permet de collecter de façon non invasive, des informations sur la taille des populations bactériennes et les niveaux de résistance aux antibiotiques au sein du microbiote intestinal. Un isolement direct, sans enrichissement préalable, sur un milieu sélectif comme le milieu MacConkey, permet de distinguer de manière présomptive l'espèce bactérienne *E. coli* sans favoriser une sous-population résistante par rapport à une autre. L'ajout d'un antibiotique dans le milieu permet à l'inverse de sélectionner les bactéries résistantes. La mise en œuvre de méthodes de comptage sur milieu sans et avec antibiotique permet de quantifier la population totale et la sous population résistance. Un suivi dans le temps des deux populations rend compte de l'évolution du pourcentage de résistance chez *E. coli*.

2.1.2. Techniques moléculaires

Les techniques d'identification ainsi que les critères de classification ont évolué avec le développement des techniques de biologie moléculaire. Alors que les méthodes phénotypiques se basent sur des caractères morphologiques, biochimiques, antigéniques ou encore culturels, les techniques moléculaires se basent sur l'étude de la présence de certains gènes ou de séquences d'ADN spécifiques (facteurs de virulences particuliers, résistance à une famille d'antibiotique etc.). Des recombinaisons génétiques au sein de l'espèce *E. coli* ont conduit peu à peu certaines souches à diverger et à donner naissance à de nouvelles lignées de clones, qui ont pu être mises en évidence par l'analyse de l'ADN, notamment par la technique du « MultiLocus Sequence Typing » (MLST). L'espèce *E. coli* se décline en 7 groupes phylogénétiques principaux A, B1, B2, C, D, E et F. Les souches de ces groupes phylogénétiques ont des capacités de colonisation du tube digestif et de pathogénicités intestinales et extra-intestinales différentes. Les souches des groupes A et B1, qui ont émergé au même moment, vont occuper les mêmes niches écologiques mais des niches différentes de celles qu'occupent les souches des groupes B2 et D. Les souches du groupe B2 sont particulièrement virulentes et sont classées comme des souches pathogènes [144]. La structure de répartition des groupes phylogénétiques d'*E. coli* au sein de son hôte est dynamique, même si elle est spécifique et propre à chaque individu. Cette structure peut évoluer au cours du temps, sous la pression de facteurs complexes et multifactoriels, dont la pression antibiotique. La technique de « polymerase chain reaction » (PCR) permet actuellement de distinguer rapidement le groupe phylogénétique d'un isolat bactérien [145]. L'analyse des groupes phylogénétiques *E. coli* dans le microbiote intestinal des porcs est une méthode utile pour mesurer l'impact biologique des résidus d'antibiotiques sur la diversité clonale des populations bactériennes dans le temps.

L'étude de l'évolution du microbiome intestinal (étude de l'évolution de toutes les espèces bactériennes) sous pression antibiotique est également possible grâce à la métagénomique en utilisant les méthodes comme le séquençage 16S et le séquençage *shotgun*.

- Le séquençage 16S est une analyse ciblée basée sur le séquençage du gène codant l'ARN 16S, qui est présent dans toutes les bactéries. Cette analyse permet d'étudier l'abondance des espèces bactériennes dans le microbiote intestinal.

- Le séquençage *shotgun* est une analyse non ciblée qui séquence tout l'ADN présent dans un échantillon sous forme de fragments. Cette analyse permet d'avoir une vision plus globale de la composition de l'ADN du microbiome et permet d'accéder à des informations au niveau génétique telles que la présence de gènes de résistance aux antibiotiques, de gènes associés aux plasmides.

2.2. Sensibilité aux antibiotiques

2.2.1. Techniques phénotypiques

L'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques repose sur l'évaluation de l'activité des antibiotiques, exprimée par la CMI, c'est à dire la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne visible. Cette concentration peut être déterminée par dilution en milieu liquide ou solide, ou par micro-dilution. Les méthodes de dilution consistent à préparer, en milieu liquide ou solide (gélosé), des concentrations croissantes d'antibiotiques afin d'obtenir une gamme de dilution. Ensuite, un inoculum bactérien calibré est mis en contact avec chaque concentration d'antibiotique. Après incubation, la CMI est déterminée en regardant la première concentration où la croissance bactérienne est inhibée. Des méthodes commerciales de micro-dilution en milieu liquide utilisent des microplaques avec des puits contenant des antibiotiques sous forme déshydratée, qui vont être réhydratés par une suspension bactérienne calibrée. Cette méthode, utilisée lors de ces travaux de thèse, est une technique rapide, utilisée en surveillance (et, donc, standardisée) et qui couvre un grand panel d'antibiotiques.

Quelle que soit la méthode utilisée, la CMI est comparée à des valeurs de référence qui permettent, selon le seuil utilisé (épidémiologique ou clinique), de classer une souche en sauvage (dite « sensible ») ou non sauvage (dites « résistante »). Les référentiels les plus connus sont celui du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), utilisé aux Etats-Unis, et celui de l'EUCAST, utilisé en Europe.

2.2.2. Techniques moléculaires

Les techniques moléculaires permettent l'identification d'éléments génétiques de résistance. Parmi ces techniques se trouve la PCR ou la PCR quantitative (qPCR), qui permettent de

détecter, ou quantifier dans le cas d'une qPCR, des gènes de résistance dans une souche ou dans une communauté bactérienne. Il s'agit d'une méthode ciblée donc les gènes doivent être connus et sélectionnés préalablement.

Ensuite, comme mentionnée précédemment, la métagénomique *shotgun* permet la détection de gènes de résistance dans le microbiome. S'agissant d'une analyse non ciblée, il n'est pas nécessaire de sélectionner les gènes avant le séquençage. Néanmoins, le traitement des données obtenues est complexe et chronophage.

PARTIE II : RESULTATS

I- Développement et validation de la méthode analytique

Le premier objectif de ce travail de recherche a été de développer des méthodes analytiques LC-MS/MS afin de quantifier les quatre antibiotiques de choix (amoxicilline, oxytétracycline, sulfadiméthoxine et triméthoprime) dans différentes matrices de porc : plasma, fèces, muscle, foie et rein. Les méthodes sont basées sur une extraction liquide-liquide ou solide-liquide avec l'acétonitrile pour le plasma, le muscle, le foie et le rein, et sur une SPE après extraction par un tampon McIlvaine/EDTA pour les fèces. Elles ont été toutes validées selon l'approche du profil d'exactitude, excepté l'amoxicilline dans les fèces, pour laquelle la méthode n'a pas pu être finalisée suite à des problèmes d'extraction. Les méthodes ont ensuite été appliquées lors d'une étude pilote pendant laquelle trois groupes de deux porcs ont reçu une alimentation contaminée avec l'amoxicilline, l'oxytétracycline ou l'association sulfadiméthoxine/triméthoprime. Le taux de contamination était de 2% de la dose posologique, car il s'agit d'un taux toléré par les BPF en France [51]. Des prélèvements de plasma et fèces ont été effectués régulièrement pendant l'étude et les tissus ont été récupérés lors de l'abattage des animaux. Ces résultats ont servi comme données préliminaires pour optimiser les études ultérieures.

Un résumé de la méthode analytique est présentée dans la figure 41.

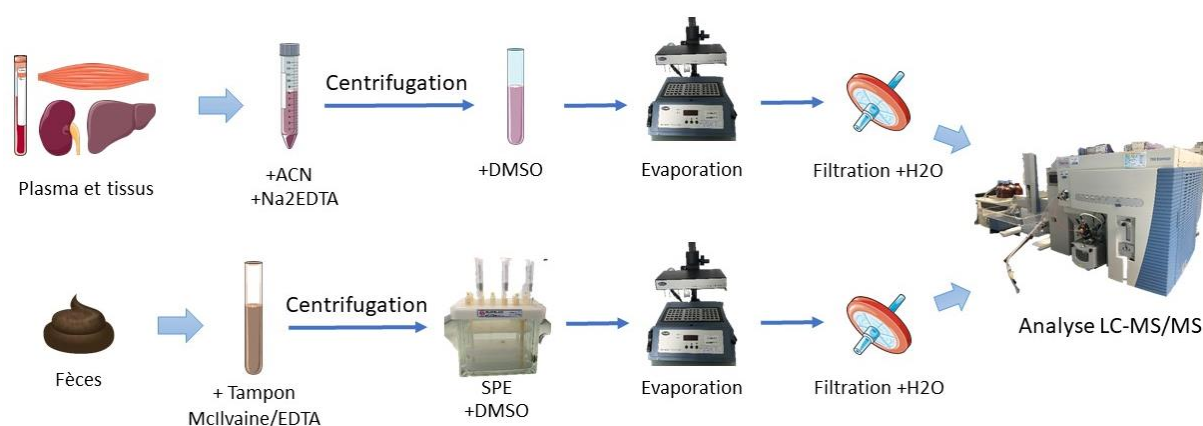
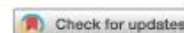


Figure 41. Méthode analytique pour le dosage des antibiotiques (amoxicilline, oxytétracycline, sulfadiméthoxine et triméthoprime) dans les différentes matrices de porc (plasma, muscle, foie, rein et fèces)*

Ces travaux ont fait objet d'un article scientifique publié dans le journal « *Food Additives and Contaminants: Part A* ».

Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., Hurtaud-Pessel, D., Laurentie, M., Viel, A., Taillandier, J-F., Lagree, M-P. & Gaugain, M. (2022): Validation of a LC-MS/MS method for the quantitative analysis of four antibiotics in pig tissues and plasma to assess the risk of transfer of residues to edible matrices after exposure to cross-contaminated feed. *Food Additives & Contaminants: Part A*.



Validation of a LC-MS/MS method for the quantitative analysis of four antibiotics in pig tissues and plasma to assess the risk of transfer of residues to edible matrices after exposure to cross-contaminated feed

Cristina Santos-Santórum Suárez , Pascal Sanders , Agnès Perrin-Guyomard , Dominique Hurtaud-Pessel , Michel Laurentie , Alexis Viel , Jean-François Taillandier, Marie-Pierre Lagree and Murielle Gaugain 

ANSES-Fougères Laboratory (French National Agency for Food, Environment and Occupational Health & Safety), Fougères Cedex, France

ARTICLE HISTORY

Received 30 June 2022
Accepted 13 September 2022

KEYWORDS

Chromatography – LC-MS/MS; method validation; veterinary drug residues; antibiotics

ABSTRACT

Cross-contamination between medicated and non-medicated feed can occur during production, processing, transport or storage of animal feed. This may lead to the presence of low concentrations of antibiotics in supposedly drug-free feed for food production animals, which potentially could also harm consumers due to residues. In addition, consumption of sub-therapeutic concentrations of antibiotics may increase the risk of emergence of resistant bacteria. In this study, LC-MS/MS methods were developed to quantify four antibiotics (sulfadimethoxine, oxytetracycline, trimethoprim and amoxicillin) in several pig matrices, i.e. plasma, muscle, liver, kidneys and faeces. All methods were validated using the accuracy profile, except for amoxicillin in faeces, for which extraction could not be optimised for low concentrations. These methods were then applied as part of an animal study during which several pigs received contaminated feed at a concentration corresponding to 2% of therapeutic dose, in order to evaluate the risk of the presence of residues in animal faeces and tissues. The results showed that sulfadimethoxine is well absorbed and accumulates in the muscle, kidneys and liver, where concentrations were higher than the maximum residue limits (MRLs) authorised in EU legislation. Conversely, oxytetracycline was mostly found in faeces as its oral absorption is very low. Trimethoprim concentrations were slightly higher than the tolerated MRL in the kidneys, but they were below this level in the other tissues. Finally, amoxicillin concentrations remained below the lower limit of quantification of the methods in all matrices.

Introduction

Proper use of antibiotics is a current issue that the general public is now aware of. One of the areas of concern is antibiotic use in animal husbandry. The use of antibiotics as growth promoters has been banned in the European Union since 2006 by Regulation (EC) No. 1831/2003 (European Commission 2003), but their addition to feed as a method of treating infectious diseases is still widespread (Stolker et al. 2013; Barbosa Da Silva et al. 2019) and authorised by veterinary drugs regulations.

In parallel, European legislation regulates all processes that may affect animal feed, from

manufacture to use (European Commission 2018). Although this regulation exists, carry-over between different types of feed may happen and this may lead to cross-contamination between medicated and non-medicated feed. This has already been reported in several articles and appears to be unavoidable, even when flushing procedures are used for cleaning the production lines (McEvoy 2002; Borràs et al. 2011; Stolker et al. 2013; Barbosa Da Silva et al. 2019). Research studies have shown that cross-contamination can occur at different levels of feed manufacture as it can occur during production, because of the use of joint production lines for both medicated or not medicated feed, but also

CONTACT Cristina Santos-Santórum Suárez  cristina.santossantorum.ext@anses.fr  ANSES-Fougères Laboratory (French National Agency for Food, Environment and Occupational Health & Safety), Fougères Cedex, France

© 2022 Taylor & Francis Group, LLC

during transport or storage. Also, many factors can influence carry-over, such as the compound's properties, factory equipment or human handling, and this makes it even more difficult to control and avoid cross-contamination.

This problem was demonstrated by Gaugain et al. (2020). During 2017 and 2018, 100 pig, poultry and rabbit feed samples were collected per year from several farms in France as part of a national monitoring plan. These samples were analysed for 11 antimicrobials belonging to seven different families. The results showed that 15% of samples were contaminated with at least one antimicrobial at a concentration higher than 1 mg/kg.

Also, Przeniosło-Siwczyńska et al. (2020) analysed more than 300 feed samples in Poland, including cattle feed, poultry feed, pig feed, concentrates/premixes and feed materials. In this study, they looked for tetracyclines and they found that around 12% of the samples were contaminated with these antimicrobials, in particular with chlortetracycline, doxycycline and oxytetracycline.

Finally, Robert et al. (2016) analysed feed samples in Belgium in 2016 and found the presence of contamination in 20% of samples, at concentrations higher than the maximum tolerated 1% carry-over rate in Belgium.

Until now, no maximum contamination levels for antibiotics have been established in European regulations. In France, the Ministry of Agricultural and Fisheries published Good Manufacturing Practices in 2007 concerning medicated feed and established maximum contamination rates that were 5% for the first batch following the production of medicated feed and 1% for the next batch (French Ministry of Agriculture and Fisheries, 2007).

Recently, the European Food Safety Authority (EFSA) published a report describing the assessment of maximum cross-contamination levels that was requested for 24 antimicrobials in order to avoid development of resistant bacteria (Hazards et al. 2021). The determined levels with no effect for the emergence of antimicrobial resistance or for selection of resistant strains are very low, largely below the established MRLs for the same antibiotics in tissues of food production animals, and also largely below the concentrations found during the

two monitoring plans on feed carried out in France (Gaugain et al. 2020).

The consumption of contaminated feed by food production animals may have several risks for both animals and consumers. First, a transfer of antimicrobial residues to animal tissues, plasma and faeces can occur. This has already been described in several studies and may lead to harmful effects in humans (McEvoy 2002; Leeman et al. 2007; Segato et al. 2011; Peeters et al. 2016). However, no experimental studies conducted in pigs have demonstrated this risk of transfer of antimicrobial residues to edible tissues nor assessed the levels reached.

Moreover, consumption of low concentrations of antimicrobials as well as their presence at these levels in the animal gut may select resistant bacterial strains (Gullberg et al. 2011; Holman and Chénier 2013; Sandegren 2014; Peeters et al. 2018). Thus, the objective of this study was to develop and validate LC-MS/MS analytical methods using the accuracy profile to determine the presence of four antimicrobials at residual rates in several pig matrices (plasma, faeces, muscle, liver and kidneys). The aim was to develop a single method to quantify the four selected drugs, which were amoxicillin (AMOX), oxytetracycline (OTC), sulfadimethoxine (SDMT) and trimethoprim (TMP), using either liquid–solid or solid–solid extraction or solid-phase extraction (SPE). This choice was based on the frequency of use in veterinary medicine as a premix for medicated feed in France (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety et al. 2019), as well as on the contamination rates in feed found during monitoring plans in the country (Gaugain et al. 2020).

These analytical methods were then applied as a part of an *in vivo* pilot study where pigs received feed containing the target antibiotics at cross-contamination levels in order to assess the risk of transfer of antimicrobial residues to animal tissues.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Methanol for high-performance liquid chromatography, Optima liquid chromatography/mass

spectrometry grade methanol, ethylenediaminetetraacetic acid disodium dihydrate (Na_2EDTA) and citric acid monohydrate were obtained from Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Formic acid and disodium hydrogen phosphate were purchased from Merck (Fontenay-sous-Bois, France) and dimethyl sulfoxide (DMSO) from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

Standards of AMOX, OTC hydrochloride, SDMT, tetracycline hydrochloride, TMP and trimethoprim-d9 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France); amoxicillin-d4 trihydrate was obtained from Witega (Berlin, Germany) and sulfadimethoxine-d6 from Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France).

Preparation of solutions and standards

A solution of Na_2EDTA 20 mmol/L was prepared for the liquid-liquid and liquid-solid extractions. A McIlvaine/EDTA buffer was prepared for the SPE by mixing Na_2HPO_4 and citric acid monohydrate, adjusting pH to 4, and then adding Na_2EDTA .

Stock standard solutions were prepared separately at 0.5 mg/mL. OTC, SDMT, sulfadimethoxine-d6, tetracycline and trimethoprim-d9 solutions were prepared in methanol, while AMOX, amoxicillin-d4 and TMP solutions were prepared in ultrapure water/methanol (50:50, v/v). All stock standard solutions were stored at -18°C .

Three intermediate solutions were prepared according to the target matrices. For plasma, kidney and liver analysis, the intermediate solution was prepared by diluting the four stock standard solutions in ultrapure water to obtain a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution. For muscle analysis, a second intermediate solution was prepared at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for OTC, SDMT and TMP and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for AMOX. Finally, a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ intermediate solution containing OTC, SDMT and TMP was prepared for faeces analysis. All these intermediate solutions were diluted to obtain several working standard solutions at increasing concentrations to prepare the matrix calibration curves. Working standard solutions were stored at 4°C for 7 days.

For kidney, liver and muscle extractions, an internal standard working solution containing

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of sulfadimethoxine-d6, tetracycline and trimethoprim-d9 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amoxicillin-d4 was prepared. For plasma extraction, an internal standard working solution containing amoxicillin-d4 at 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tetracycline at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and sulfadimethoxine-d6 and trimethoprim-d9 at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was prepared. Lastly, for faeces extraction, sulfadimethoxine-d6, tetracycline and trimethoprim-d9 were diluted in ultrapure water to obtain a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ internal standard working solution. Internal standard working solutions were stored at 4°C .

Sample preparation and extraction

Plasma, kidney, liver and muscle extraction

For plasma, kidney, liver and muscle samples, liquid-liquid or liquid-solid extraction was carried out. For plasma samples, aliquots of 200 μL were taken, while for kidneys, liver and muscle, aliquots of 1 ± 0.01 g of ground matrix were weighed and homogenised.

First, 50 μL of ultrapure water were added to plasma samples and 250 μL to tissue samples. Next, 100 μL of internal standard working solution were added to plasma samples and 200 μL were added to kidney, liver and muscle samples. After adding a Na_2EDTA 20 mmol/L solution (100 μL to plasma samples and 250 μL to tissue samples) and vortexing for 10 s, acetonitrile was added (1 mL for plasma and 4 mL for tissues), and all samples were stirred for 10 min in a rotatory stirrer. After centrifugation at $20,000 \times g$ at 4°C for 5 min for plasma and 10 min for tissues, the supernatant was transferred to a tube containing 50 μL of DMSO and evaporated under nitrogen at 50°C . Due to its high boiling point, DMSO was used as a keeper to avoid full evaporation and prevent possible degradation of compounds. The residue was then resuspended in 250 μL of ultrapure water for plasma samples and in 450 μL for tissues samples and vortexed for 10 s. Finally, solutions were filtered through 0.45 μm filters and transferred to liquid chromatography vials.

Faeces extraction

Aliquots of 1 ± 0.01 g of faeces were weighed and transferred to polypropylene tubes. First, 250 μL of ultrapure water and 100 μL of internal standard

working solution were added. After vortexing, 5 mL of McIlvaine/EDTA buffer were added and samples were shaken in a rotatory stirrer for 10 min. Then, after centrifugation at $14,000 \times g$ and 4°C for 10 min, the supernatant was collected.

SPE columns (Oasis HLB 3 cc/60 mg) (Waters, Guyancourt, France) were conditioned with 3 mL of methanol and then 3 mL of ultrapure water. A reservoir with a GF/A 1.6 μm Whatman filter was placed on the SPE column, and the supernatant previously collected was loaded onto it. Columns were washed with 3 mL of ultrapure water and analytes were eluted with methanol (1.5 mL added twice) into a tube containing 50 μL of DMSO. Samples were then evaporated at 50°C under nitrogen flow and the residue was recovered in 500 μL of ultrapure water. Centrifugation at $3500 \times g$ for 5 min at 4°C was carried out before filtering the solution through 0.45 μm filters and transferring to LC vials.

Preparation of matrix-fortified standards

A matrix-fortified calibration range was prepared for each matrix by spiking five test portions with different working standard solutions containing the analytes at known concentrations. These working solutions were prepared previously by diluting the intermediate standard solution to obtain different suitable concentrations. A blank standard (CS0) was also prepared by adding ultrapure water. The matrix-fortified calibration ranged from 10 ng/mL or ng/g to 1000 ng/mL or ng/g for each analyte in all matrices, except for AMOX in muscle where the range was from

10 ng/g to 2000 ng/g. Due to extraction issues, AMOX was not added because it was not detected in faeces. For each calibration range, five or six spiking levels were prepared.

LC-MS/MS analysis

LC-MS/MS conditions were the same regardless of the biological or tissue matrix analysed. Analysis was performed on an LC-MS/MS system composed of an Accela Pump and a Thermo Pal autosampler coupled to a TSQ Vantage triple quadrupole mass spectrometer from Thermo Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). Chromatographic separation was achieved with a Kinetex Biphenyl column from Phenomenex (100×2.1 mm, $2.56 \mu\text{m}$) protected by a C18 guard column (4 mm \times 2 mm) and heated to 28°C . A gradient of the two mobile phases (A: 0.2% formic acid in water, B: 0.2% formic acid in methanol) was applied starting at 90% of mobile phase A for 1 min; then going from 90% to 2% from minute 1 to minute 3, and then going back to a constant rate of 90% from minute 3.1 until the end of the run (acquisition time = 7.5 min). The flow rate was 350 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Mass spectrometry acquisition based on positive electrospray ionisation mode (ESI+) and multiple reaction monitoring (MRM) was used. The $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion was selected as precursor ion for all compounds combined to two product ions for targeted analytes and one product ion for internal standard. For AMOX, a second precursor ion was selected $[\text{M} + \text{H} - \text{NH}_3]^+$ with one product ion (all parameters are shown in Table 1). Cycle time was 0.5 s and the time window was

Table 1. LC-MS/MS parameters for all target analytes and internal standards.

Compound		Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	S-lens	Collision energy (eV)	Retention time (min)	Internal standard
Amoxicillin	$[\text{M} + \text{H}]^+$	366.1	114.0	77	20	2.85	Amoxicillin-d4
	$[\text{M} + \text{H}]^+$	366.1	349.0	77	5	2.85	
	$[\text{M} + \text{H} - \text{NH}_3]^+$	349.0	114.0	94	20	2.84	
Amoxicillin-d4 ^a	$[\text{M} + \text{H}]^+$	370.1	114.0	75	22	2.85	-
Oxytetracycline	$[\text{M} + \text{H}]^+$	461.1	426.1	117	19	3.49	Tetracycline
	$[\text{M} + \text{H}]^+$	461.1	201.0	117	37	3.49	
Sulfadimethoxine	$[\text{M} + \text{H}]^+$	311.0	156.0	95	22	3.89	Sulfadimethoxine-d6
	$[\text{M} + \text{H}]^+$	311.0	108.0	95	31	3.89	
Sulfadimethoxine-d6 ^a	$[\text{M} + \text{H}]^+$	317.1	162.1	95	22	3.89	-
Tetracycline ^a	$[\text{M} + \text{H}]^+$	445.1	410.1	105	21	3.54	-
Trimethoprim	$[\text{M} + \text{H}]^+$	291.1	230.1	112	23	3.37	Trimethoprim-d9
	$[\text{M} + \text{H}]^+$	291.1	123.0	112	32	3.37	
Trimethoprim-d9 ^a	$[\text{M} + \text{H}]^+$	300.2	234.19	119	25	3.37	/

^aInternal standard.

2 s. The rest of the parameters in the source were: vaporiser temperature = 250 °C; transfer capillary temperature = 350 °C; sheath gas pressure = 50 (arbitrary units); auxiliary gas pressure = 30 (arbitrary units); ion sweep gas pressure = 3 (arbitrary units); collision gas pressure (argon) = 1 mT and spray voltage = 2500 V.

Performance and method validation procedures

The validation procedure aimed to evaluate the following performances: precision, trueness, linearity and the range of validation of the method (lower and upper limits of quantification). Two types of matrix-fortified standards were prepared: calibration standards (CSs) and validation standards (VSs). CSs were used to establish the response function and VSs enabled us to determine trueness, precision, linearity and, therefore, accuracy of the method (Hubert et al. 2007).

Validation was carried out on 3 days. Each day, two series of five to six calibration standards, depending on the matrix, were prepared with concentrations corresponding to the calibration range explained previously. Two series of validation standards were also prepared. VS concentrations were the same as CS.

All results were processed with e-noval software (4.1 version) from PharmaLex and the accuracy profile was used for validation. The accuracy profile is a statistical tool which, by using a β tolerance interval and setting acceptance limits, allows to validate analytical methods (Rozet et al. 2007). The β tolerance interval can be defined as the interval containing β % of the future measurements. It is determined for all concentration levels. The acceptance limits may be set up based on regulatory requirements, for example, and are defined as the acceptable deviation around the reference value. In this study, the β tolerance interval was established at 80% and acceptance limits were established at 30% for the first level and 25% for the others, as a maximum. This is in agreement with the European Regulation (2002/657/EC) (European Commission 2002) requirements. E-noval software tests several regression models (linear; linear through 0 adjusting either using the lowest level or the highest; linear with logarithmic transformation; linear with square root transformation; weighted linear ($1/X$ or

$1/X^2$, X being the concentration); quadratic and weighted quadratic ($1/X$ or $1/X^2$)).

Trueness, precision and accuracy index can be calculated for each model, giving a score out of 1 for each parameter, as well as the interval dose index for which the method would be valid. This interval will give us the lower limit of quantification (LLOQ) and the upper limit of quantification (ULOQ) of the method. These limits correspond to the points where the β interval is no longer within the acceptance limits. Taking into account the results of these indices, the best regression model was chosen for each target analyte/matrix combination.

Expanded relative uncertainty was calculated by multiplying relative combined standard uncertainty by a coverage factor k , whose value is based in the level of confidence required (in this case, $k=2$).

Stability of standard solutions and spiked samples was studied according to the Commission Decision 2002/657/EC (European Commission 2002) requirements and according to internal quality procedures: solutions or spiked sample were considered stable as long as the response was $\pm 20\%$ when compared to the initial value.

Applicability of the method and animal experimental study

A pilot study, approved by the French Committee on Animal Research and Ethics (referral number: 21-035 #29960), was conducted using six pigs (all females, 8 weeks old, between 18.5 and 21 kg at the beginning of the study) that were divided into three groups of two animals each. The first group received feed containing an AMOX premix (Cofamix Amoxicilline 100 from Huvepharma, Segré-en-Anjou Bleu, France), the second received an oxytetracycline premix (OTC 40-CR from Huvepharma, Segré-en-Anjou Bleu, France), and the third received the trimethoprim/sulfadimethoxine combination premix (Trimethosulpha V from Dopharma, Vair-sur-Loire, France). The concentrations administered to animals were: 10 mg of AMOX/kg of feed per day (i.e. 0.5 mg/kg body weight), 20 mg of OTC/kg of feed per day (i.e. 1 mg/kg body weight), 14.9 mg of SDMT/kg of feed per day (i.e. 0.75 mg/kg body weight) and 3.2 mg of TMP/kg of feed per day (i.e. 0.16 mg/kg body weight). The daily dose was

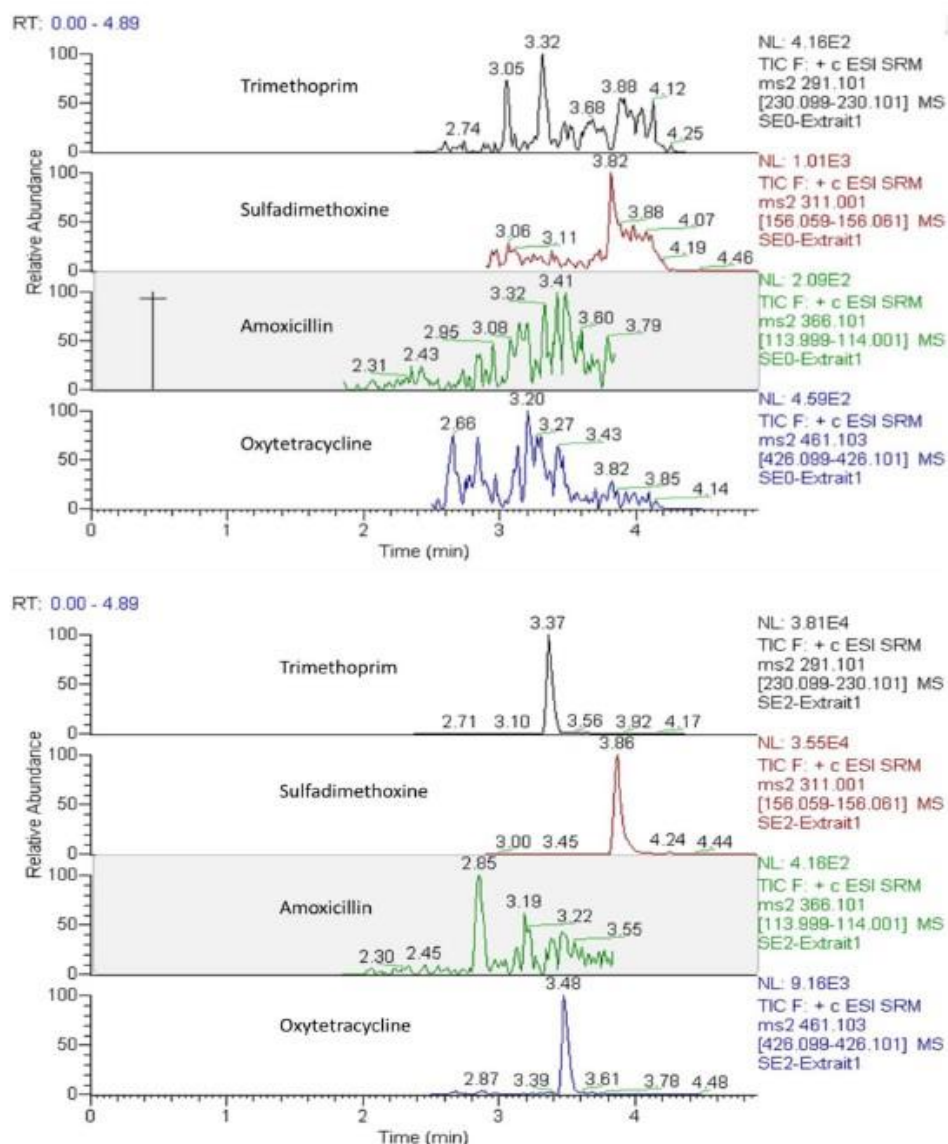


Figure 1. LC-MS/MS chromatograms of a blank pig liver sample (top) and a pig liver sample spiked at 10 ng/g (bottom) for AMOX, OTC, SDMT and TMP.

divided into two administrations a day and feed intake being 50 g of feed by kg of body weight. Animals were weighed every week and each time, the mean of these values was used to calculate the feed amount requirements, and the quantity of premix was adapted accordingly.

During the animal study, faeces were taken every day, and at the end of the study, loin and leg muscle, liver and both left and right kidneys were taken. In each group, first pig was slaughtered between 7 and 10 days after the beginning of the treatment and after 18 days for the remaining pig. All animal samples were analysed with the validated analytical methods described above.

Results and discussion

All extraction methods were based on a similar liquid-liquid or solid-liquid extraction technique, except for the faeces method, for which more complex purification was needed. The chromatograms obtained with the optimised LC-MS/MS method are presented in Figure 1.

Method validation

As explained previously, taking into account the β tolerance interval that was established at 80% and the acceptance limits, trueness, precision, accuracy and interval dose index were calculated.

Table 2. LLOQ–ULOQ interval, recovery, relative repeatability, relative intermediate precision, recovery, accuracy index and relative expanded uncertainty for each analyte in each matrix.

Compound	Matrix	LLOQ–ULOQ (ng/mL or ng/g)	Recovery (%)	Relative repeatability (CV, %)	Relative intermediate precision (CV, %)	Accuracy index	Relative expanded uncertainty (%)
AMOX	Plasma	24.73–1000	92.16–100.5	2.73–8.37	4.45–15.01	0.839	10.25–33.99
	Muscle	10–2000	98.52–103.4	0.20–6.5	1.03–6.5	0.847	2.38–14.05
	Liver	33.74–1000	97.82–106.3	2.27–5.49	3.38–14.06	0.861	8.16–32.16
	Kidney	10–1000	97.83–101.2	1.04–7.4	2.11–7.4	0.865	4.81–15.98
OTC	Plasma	10–1000	93.7–101.3	1.69–7.10	1.77–7.10	0.863	3.84–15.33
	Muscle	10–1000	96.71–100.2	0.64–4.52	0.64–6.75	0.897	1.39–15.13
	Liver	10–1000	98.01–99.57	0.61–7.52	0.61–7.86	0.919	1.33–17.08
	Kidney	10–1000	93.1–101.6	0.68–3.52	0.9–3.52	0.880	2.01–7.61
SDMT	Faeces	20–1000	91.87–103.1	1.19–2.57	2.05–3.92	0.828	4.43–9.01
	Plasma	10–1000	97.67–100.6	2.39–3.42	2.93–3.42	0.872	5.52–7.51
	Muscle	10–1000	98.99–100.6	0.36–1.55	0.96–1.76	0.947	2.16–3.85
	Liver	16.31–1000	91.22–99.43	0.30–3.42	1.41–5.99	0.923	3.05–30.12
TMP	Kidney	10–1000	97.95–102.2	0.58–3.6	0.58–3.82	0.886	1.26–8.32
	Faeces	20–1000	98.2–100.8	0.95–4.01	1.52–4.01	0.871	3.43–20.03
	Plasma	10–1000	97.17–101.1	1.21–2.73	1.8–3.02	0.863	3.89–6.74
	Muscle	10–1000	97.64–102.2	0.81–2.65	0.81–2.80	0.948	1.76–6.10
TMP	Liver	10–1000	97.3–102.2	0.85–13.87	1.76–13.87	0.911	3.79–29.95
	Kidney	10–1000	95.53–102.5	0.35–4.15	1.03–4.15	0.867	2.35–7.05
	Faeces	20–1000	96.97–99.83	1.04–3.65	1.82–8.00	0.866	4.13–18.37

LLOQ–ULOQ: lower limit of quantification–upper limit of quantification; CV: coefficient of variation.

Depending on the results of these parameters, a regression model was chosen for each compound in each matrix to establish the response function. The regression models selected were quadratic regression and weighted linear and quadratic regression ($1/X$ and $1/X^2$).

Precision is the closeness between the measurements of a series, and represents random error. It is represented by repeatability and intermediate precision. Both parameters are expressed as coefficients of variation (CV, %) and are calculated for each concentration level. Trueness is the closeness between an accepted reference value or a true value and the average value obtained from a series of measurements, and represents systematic error. It can be expressed as absolute or relative bias or as recovery (%) for each VS concentration level. The range of these values for each compound in each matrix is shown in Table 2. Accuracy is the combination of trueness (systematic error) and precision (random error).

The accuracy profile was evaluated for each analyte in each matrix. The β tolerance interval established at 80% was inside the acceptance limits and consequently all methods were validated.

Relative uncertainty makes it possible to evaluate the dispersion of the measurements and was also determined for each concentration level. The range of results of the expanded relative

uncertainty corresponding to all concentration levels for each analyte in each matrix is shown in Table 2.

LLOQ and ULOQ define the dosing interval (see Table 2), and therefore the concentration range for which the method is valid. They correspond to the lowest and the highest VS concentration levels for all analytes in all matrices, except for AMOX and SDMT in liver, for which the LLOQs were 33.74 ng/g and 16.31 ng/g, respectively; and AMOX in plasma for which the LLOQ was 24.73 ng/mL.

Storage stability at 4 °C was assessed for the working standard solutions. Stability after two freeze–thaw cycles in spiked faeces and plasma samples was assessed, as well as stability after 30 and 60 days at –18 °C for plasma samples and at –18 °C and –80 °C for faeces samples. According to the criteria explained in the materials and methods section, the intermediate solution at 20 µg/mL was found to be stable for 21 days at 4 °C, while the working standard solutions were within the limits for only 7 days. Concerning spiked plasma and faeces samples, all analytes were considered stable after two freeze–thaw cycles and after 60 days at –18 °C for plasma and –18 °C and –80 °C for faeces, except for AMOX in plasma, which exceeded the 20% tolerance interval at day 60. No stability studies were performed on muscle as internal data were already

Table 3. Concentrations of antimicrobials found in pig tissues during the animal study compared with the tolerated MRL.

Tissue	Antibiotic (MRL in µg/kg)	Concentration in pig tissue (µg/kg)	Mean concentration (µg/kg)
Liver	AMOX (50)	<LLOQ (pig 1) <LLOQ (pig 2)	<LLOQ
	SDMT (100)	583 (pig 3) 543 (pig 4)	563 ± 28
	TMP (50)	46.6 (pig 3) 72.1 (pig 4)	59.4 ± 18
	OTC (300)	12.6 (pig 5) 18.0 (pig 6)	15.3 ± 3.9
	AMOX (50)	23.5 (pig 1) <LLOQ (pig 2)	<LLOQ
Kidney (right and left kidney, mean)	SDMT (100)	839 (pig 3) 647 (pig 4)	743 ± 112
	TMP (50)	163 (pig 3) 202 (pig 4)	182 ± 23
	OTC (600)	49.1 (pig 5) 42.2 (pig 6)	45.6 ± 4.0
	AMOX (50)	<LLOQ (pig 1) <LLOQ (pig 2)	<LLOQ
Muscle (loin and leg mean)	SDMT (100)	201 (pig 3) 193 (pig 4)	197 ± 11
	TMP (50)	21.0 (pig 3) 17.8 (pig 4)	19.4 ± 1.8
	OTC (100)	41.5 (pig 5) 40.1 (pig 6)	40.8 ± 6.0
	AMOX (50)	<LLOQ (pig 1) <LLOQ (pig 2)	<LLOQ
	OTC (100)	41.5 (pig 5) 40.1 (pig 6)	40.8 ± 6.0

MRL: maximum residue limits.

available at the laboratory and residues were known to remain stable for at least 1 year for OTC, SDMT and TMP and for 308 days in the case of AMOX.

We did not succeed in optimising a quantification method for AMOX in faeces as its extraction was insufficient at low concentrations, and the limit of quantification was too high. A preliminary assumption was that a high matrix suppression effect in faeces was responsible for the lack of sensitivity, but this was rejected after the assessment of these matrix effects. Some recovery studies were also carried out and highlighted poor extraction recovery in faeces, which could explain the sensitivity problem. Another assumption could be hydrolysis of AMOX by β -lactamase-producing bacteria in the gut. Further studies in faeces should be done to solve the extraction issues in order to improve the method and to be able to quantify low concentrations.

Animal study

All analytical methods were developed and validated in order to ensure reliable results of measurements from samples obtained during animal experiments when using these methods. These animal studies aimed to assess the presence or absence of antibiotic residues in tissues of animals

exposed to antibiotic cross-contaminated feed, as well as to study the plasma kinetics of each compound. As the animal experimental study was considered a pilot study, the results concern only two animals for each compound, and further studies with a larger number of animals will be carried out to obtain more significant data. The antibiotic concentration administered to animals corresponded to 2% of the recommended treatment dose, as this percentage is within the range of cross-contamination tolerated by good manufacturing practices of animal feed production (French Ministry of Agriculture and Fisheries 2007). Concerning the tissues, the concentrations of SDMT detected were higher than the MRLs authorised by the European Medicine Agency in liver, kidneys and muscle, with average concentrations of 583 µg/kg, 743 µg/kg and 197 µg/kg, respectively. Trimethoprim concentrations were higher than the MRLs in kidneys, with an average concentration of 182 µg/kg, and in one of the liver samples, where the amount found was 72.1 µg/kg. Finally, OTC concentrations remained below the MRL in all tissues and AMOX was below the LLOQ of the methods in all samples, except for the kidneys of one animal. All analytical results are shown in Table 3. Despite the different slaughter times, no difference between

tissues concentrations was observed, which suggests that steady state in tissue could have been achieved. For example, for SDMT, tissues concentrations found in the pig slaughtered after 7 days were similar at those found in the pig slaughtered after 18 days. This hypothesis will be assessed in future studies that will be done with a greater number of animals.

Finally, as explained before, faeces were collected every day and analysed, and the mean concentration of all samples was calculated. OTC was the compound that was present at the highest concentrations, with a mean of $12,307 \pm 920 \mu\text{g}/\text{kg}$. The SDMT concentration was $752 \pm 164 \mu\text{g}/\text{kg}$ and TMP was under the LLOQ.

These results suggest that OTC may have low oral absorption and bioavailability, as it was found mainly in faeces. This is consistent with the findings reported by Nielsen and Gyrd-Hansen (1996) and Mevius et al. (1986) in their research. However, SDMT seems to be well absorbed and tends to accumulate in tissues. Further studies with a larger number of animals are planned, first to confirm these results, and second to study each compound's kinetics in order to develop a pharmacokinetic model capable of predicting tissue concentrations in view of contamination levels. The analytical method developed for plasma will be useful in this future kinetics study.

Conclusions

All developed analytical methods were validated following the accuracy profile for all compounds in all matrices. AMOX extraction in faeces could not be optimised for low concentrations, and further studies should therefore be carried out to find the source of the problem and to improve the method.

The results of the animal study showed that, at tolerated cross-contamination rates, SDMT concentrations could be higher than the accepted MRL and this may be a risk to consumers. Moreover, determining the origin of the presence of residues could be complex: feed cross-contamination or non-respect of withdrawal period before animal slaughter. Furthermore, the low absorption rate of OTC and hence its presence at high concentrations in faeces highlight the risk of

development of resistant bacteria in animal intestinal microbiota. Additional animal studies with a larger number of animals should be performed for each compound to generate more data for modelling purposes. The results of this study could be helpful for the implementation of certain regulatory limits for cross-contamination in feed.

Acknowledgements

The authors thank Jérôme Henri and Charlotte Valentin for their help and support.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was funded by the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail [Grant No. 200263] and Région Bretagne [Grant No. 20_0311_07].

ORCID


Cristina Santos-Santórum Suárez  <http://orcid.org/0000-0001-9723-0336>


Pascal Sanders  <http://orcid.org/0000-0003-4019-480X>

Agnès Perrin-Guyomard  <http://orcid.org/0000-0002-4078-188X>

Dominique Hurtaud-Pessel  <http://orcid.org/0000-0002-6307-6382>

Michel Laurentie  <http://orcid.org/0000-0002-3677-5401>

Alexis Viel  <http://orcid.org/0000-0002-6930-9327>

Murielle Gaugain  <http://orcid.org/0000-0003-4402-0655>

References

- French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses), French Agency for Veterinary Medicinal Products (ANMV), Urban D, Chevance A, Moulin G. 2019. Sales survey of veterinary medicinal products containing antimicrobials in France in 2018.
- Barbosa Da Silva A, Back M, Daguer H, Palmeira M, Antunes De S, Ploencio L, Molognoni L, Peripolli V, Bianchi I. 2019. Carry-over and contamination of veterinary drugs in feed production lines for poultry and pigs. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 36(5):740–751. doi:10.1080/19440049.2019.1585580
- Borràs S, Companyó R, Granados M, Guiteras J, Pérez-Vendrell AM, Brufau J, Medina M, Bosch J. 2011. Analysis

- of antimicrobial agents in animal feed. *Trends Anal Chem.* 30(7):1042–1064. doi:10.1016/j.trac.2011.02.012
- [EC] European Commission. 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Commun.* L221:8–36.
- [EC] European Commission. 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. *Off J Eur Union.* L268:29–43.
- [EC] European Commission. 2018. European Commission. 2018. Regulation (EU) 2019/4 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on the manufacture, placing on the market and use of medicated feed, amending Regulation (EC) No 183/2005 of the European Parliament and of the Council and repealing Council Directive 90/167/EEC. *Off J Eur Union.* L4:1–23.
- French Ministry of Agriculture and Fisheries. 2007. Décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux. *J Off Républ Franç.* 20.
- Gaugain M, Fourmond MP, Fuselier R, Verdon E, Roudaut B, Pessel D. 2020. Control of antimicrobials in feed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: assessment of cross-contamination rates at the farm level. *J Agric Food Chem.* 68(34):9033–9042. doi:10.1021/acs.jafc.0c02999
- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilback C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* 7(7): e1002158. doi:10.1371/journal.ppat.1002158
- Hazards EPoB, Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, et al. 2021. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 1: Methodology, general data gaps and uncertainties. *EFSA J.* 19(10):e06852. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6852
- Holman DB, Chénier MR. 2013. Impact of subtherapeutic administration of tylosin and chlortetracycline on antimicrobial resistance in farrow-to-finish swine. *FEMS Microbiol Ecol.* 85(1):1–13. doi:10.1111/1574-6941.12093
- Hubert P, Nguyen-Huu JJ, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon PA, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, et al. 2007. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal – Part II. *J Pharm Biomed Anal.* 45(1):70–81. doi:10.1016/j.jpba.2007.06.013
- Leeman WR, Van Den Berg KJ, Houben GF. 2007. Transfer of chemicals from feed to animal products: the use of transfer factors in risk assessment. *Food Addit Contam.* 24(1):1–13. doi:10.1080/02652030600815512
- McEvoy JDG. 2002. Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal Chim Acta.* 473(1–2):3–26. doi:10.1016/S0003-2670(02)00751-1
- Mevius DJ, Vellenga L, Breukink HJ, Nouws JF, Vree TB, Driessens F. 1986. Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in piglets following intravenous and oral administration. *Vet Q.* 8(4):274–284. doi:10.1080/01652176.1986.9694056
- Nielsen P, Gyrd-Hansen N. 1996. Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *J Vet Pharmacol Ther.* 19(4):305–311. doi:10.1111/j.1365-2885.1996.tb00054.x
- Peeters LE, Daeseleire E, Devreese M, Rasschaert G, Smet A, Dewulf J, Heyndrickx M, Imberechts H, Haesebrouck F, Butaye P, et al. 2016. Residues of chlortetracycline, doxycycline and sulfadiazine-trimethoprim in intestinal content and feces of pigs due to cross-contamination of feed. *BMC Vet Res.* 12(1):209. doi:10.1186/s12917-016-0803-8
- Peeters LEJ, Croubels S, Rasschaert G, Imberechts H, Daeseleire E, Dewulf J, Heyndrickx M, Butaye P, Haesebrouck F, Smet A. 2018. Effect of residual doxycycline concentrations on resistance selection and transfer in porcine commensal *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 51(1):123–127. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.04.018
- Przeniosło-Siwczyńska M, Patyra E, Grelik A, Chyłek-Purchała M, Kozak B, Kwiatek K. 2020. Contamination of animal feed with undeclared tetracyclines-confirmatory analysis by liquid chromatography-mass spectrometry after microbiological plate test. *Molecules (Basel, Switzerland).* 25(9):2162. doi:10.3390/molecules25092162
- Robert C, Brasseur PY, Dubois M, Delahaut P, Gillard N. 2016. Development and validation of rapid multiresidue and multi-class analysis for antibiotics and anthelmintics in feed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A.* 33(8):1–12. doi:10.1080/19440049.2016.1207808
- Rozet E, Wascotte V, Lecouturier N, Prétat V, Dewé W, Boulanger B, Hubert P. 2007. Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation: Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Anal Chim Acta.* 591(2):239–247. doi: 10.1016/j.aca.2007.04.002
- Sandegren L. 2014. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *UPS J Med Sci.* 119(2): 103–107. doi:10.3109/03009734.2014.904457
- Segato G, Benetti C, Angeletti R, Montesissa C, Biancotto G. 2011. Doxycycline and sulfadimethoxine transfer from cross-contaminated feed to chicken tissues. *Food Addit Contam Part A.* 28(7):860–868. doi:10.1080/19440049.2011.569574
- Stolker AA, Manti V, Zuidema T, van Egmond H, Deckers ER, Herbes R, Hooglugt J, Olde Heuvel E, de Jong J. 2013. Carry-over of veterinary drugs from medicated to non-medicated feeds in commercial feed manufacturing plants. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 30(6):1100–1107. doi:10.1080/19440049.2013.794308

II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale

Le deuxième objectif de ce projet a été d'évaluer le risque de présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale suite à l'exposition d'un groupe de porcs à une alimentation contaminée. Deux expérimentations animales ont été effectuées, la première avec administration d'un aliment supplémenté sulfadiméthoxine/triméthoprim et la seconde avec administration d'un aliment supplémenté en oxytétracycline.. Les deux études et leurs résultats seront présentés ci-dessous.

1. Etude avec l'association sulfadiméthoxine/triméthoprim

Pour cette étude, un groupe de huit porcs ont reçu une alimentation contenant l'association sulfadiméthoxine/triméthoprim à 2% de la dose posologique. Des échantillons de plasma et de fèces ont été prélevés tout au long de l'étude. Après 12 jours, les animaux ont été abattus et les tissus (muscle, foie et rein) ont été prélevés. Les échantillons ont été analysés par LC-MS/MS avec les méthodes développées et validées auparavant. La possibilité de dépassement des LMRs a été évaluée. Afin de prédire le risque de dépassement de LMR, un modèle pharmacocinétique a été construit pour la sulfadiméthoxine à partir des données plasmatiques. En tenant compte des concentrations retrouvées dans les tissus lors de l'abattage, des simulations ont été réalisées afin de prédire la concentration tissulaire en fonction du taux de contamination dans l'aliment. De plus, les échantillons de foie ont été analysés par HRMS, avec des approches ciblée et non ciblée, et comparés à des échantillons contrôle afin d'identifier les potentiels métabolites de la sulfadiméthoxine.

La figure 42 représente un résumé de l'étude.

II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale

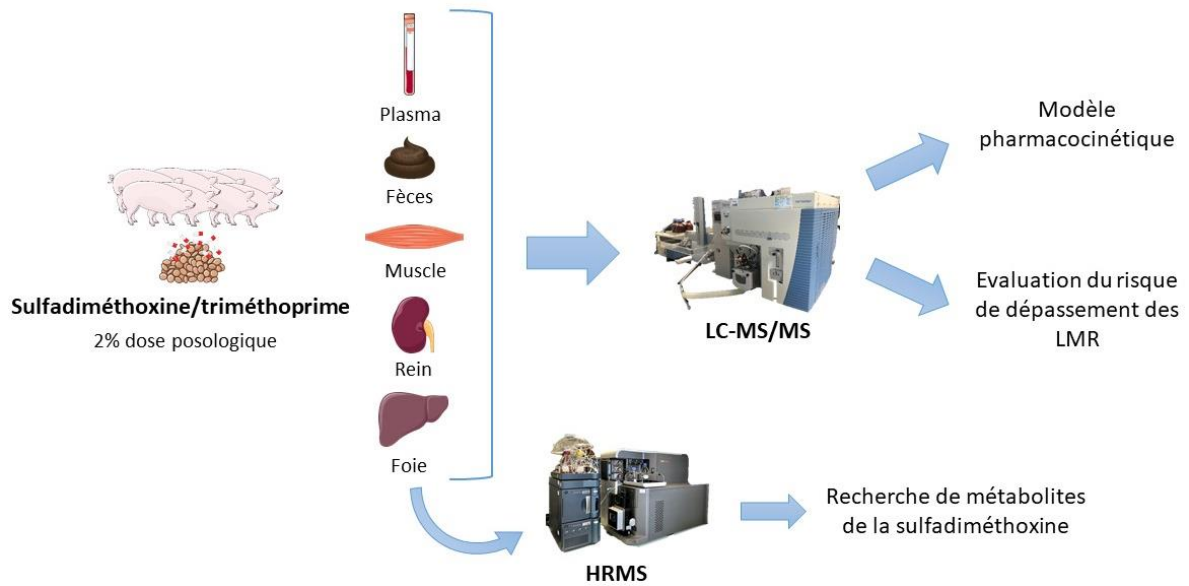


Figure 42. Synthèse de l'étude animale réalisée avec l'association sulfadiméthoxine/triméthoprime*

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis en août 2023 au journal « Journal of Agricultural and Food Chemistry ».

Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., Laurentie, M., Taillandier, J-F., Lagree, M-P., Viel, A. & Gaugain, M.: Assessment of the risk of antimicrobial residues in edible pig tissues after exposure to cross-contaminated feed: a case study with sulphadimethoxine/trimethoprim. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Soumis Août 2023.

Les supplementary data de cet article se trouvent en annexe .

1 **Presence of antimicrobial residues in edible pig tissues after**
2 **exposure to cross-contaminated feed: a pharmacokinetics case study**
3 **with sulphadimethoxine/trimethoprim**

4 Cristina Santos-Santórum Suárez, Pascal Sanders, Agnès Perrin-Guyomard, Michel Laurentie,
5 Jean-François Taillandier, Marie-Pierre Lagree, Murielle Gaugain*[†] & Alexis Viel[†]

ANSES-Fougères Laboratory (French National Agency for Food, Environment and Occupational
Health & Safety), 10 B, rue Claude Bourgelat – Javené, CS 40608, 35306 Fougères Cedex,
France

6 * corresponding author: E-mail address: murielle.gaugain@anses.fr

7 [†] These authors share last authorship

8 **1. Abstract**

9 A topical concern is the responsible use of antibiotics in veterinary medicine and control of
10 antimicrobial residues in edible products. When manufacturing oral premixes, cross-
11 contamination may occur between medicated and non-medicated feed, leading to
12 unavoidable traces of antibiotics in animal feedstuff. The exposure of food-producing animals
13 to low antibiotic concentrations can result in antimicrobial residues in edible products. This
14 project was designed to assess, by LC-MS/MS analysis, the presence of antibiotic residues in
15 edible pig tissues, faeces and plasma after a chronic exposure to a mimed cross-contaminated
16 feed with a sulphadimethoxine/trimethoprim combination. The presence of
17 sulphadimethoxine metabolites in liver was also evaluated by LC-HRMS. Our results show that,
18 at the tolerated contamination rates in France, sulphadimethoxine concentrations can exceed

19 the MRL and that putative metabolites can also be detected in the liver of pigs. Based on the
20 plasma and tissue data, a population pharmacokinetic model was developed and predicted
21 that a maximal contamination of 0.2% of the therapeutic dose would not result in
22 sulphadimethoxine concentrations above the MRL in at least one edible tissue.

23 **Keywords** : antibiotic residues, cross-contamination, LC-MS/MS, HRMS, pharmacokinetics

24 **2. Introduction**

25 The use of antimicrobials in veterinary medicine has been decreasing in Europe over the last
26 decade [1]. However, their administration to prevent or treat infectious diseases is still
27 widespread. Although several routes of administration exist, the oral route for medication is
28 widely used via premixes [1]. These are veterinary medicines intended to be added to
29 feedstuff, which is thus known as medicated feed [2]. However, medicated feed is usually
30 manufactured on the same production lines used for non-medicated feed. This situation can
31 lead to contamination, i.e. the uncontrolled presence of antimicrobials in animal feedstuff [3,
32 4]. This carry-over, which has already been reported on several occasions [5-8], seems to be
33 unavoidable because it depends on several factors and can take place not only at the feed
34 mill, but also during transport or storage on the farm [3, 9]. Although no contamination limits
35 have been established by European legislation, the French Ministry of Agricultural and
36 Fisheries published good manufacturing practices (GMPs) setting maximum contamination
37 rates [10]. These GMPs established that the first batch of non-medicated feed following a
38 medicated one should not be contaminated by more than 5%, and the following batches by
39 no more than 1%.

40 When cross-contamination occurs, it will result in exposure of animals to low antibiotic
41 concentrations, which may involve several risks. Firstly, there may be toxic effects in animals

42 exposed to substances not intended for certain animal species, such as lincomycin in cows or
43 some ionophores in pigs [11]. Secondly, as antibiotic concentrations in contaminated feed are
44 low, animals may be exposed to subtherapeutic concentrations. This is known to increase the
45 selection of resistant bacteria, which may then spread to humans or to the environment [12-
46 15]. Furthermore, consumption of contaminated feed may lead to residues in edible products,
47 which could be a risk for consumers. Indeed, exposure to antibiotics can cause allergic
48 reactions, perturbation of the intestinal microbiota and even blood disorders. Metabolites of
49 some veterinary medicinal products are also known to cause undesirable side effects [16].
50 Moreover, just as in animals, exposure of consumers to antimicrobial residues through food
51 increases the risk of developing antibiotic resistance in the gut microbiota [14, 16].

52 In order to protect public health, the European Union has established maximum residue limits
53 (MRLs) for all pharmacological active substances. These MRLs are the maximum authorised
54 levels of these molecules in edible products of animal origin [17]. In order to comply with these
55 limits, withdrawal periods are applied to food-producing animals, i.e. minimum times
56 between the last administration of a veterinary medicine and the collection of edible products
57 from this animal [18]. However, when there is uncontrolled exposure of animals to antibiotics
58 due to cross-contamination in feed, the concept of withdrawal periods is not applicable,
59 therefore antimicrobial residues could be present in animal products at concentrations higher
60 than the authorised MRL [19].

61 The combination of sulphonamide/trimethoprim are among the most often used antibiotic
62 family in pig production, as they are in category D of the European Medicines Agency (EMA)
63 categorisation of antibiotics [20] that promotes to use them in priority compared to the other
64 antibiotic classes present in categories A to C. Within the sulphonamide family,

65 sulphadimethoxine has a good oral bioavailability in pigs, as well as a long half-life, which
66 supports the possible presence of residues in tissue in case of feed cross-contamination [21,
67 22]. That is why the combination of sulphadimethoxine/trimethoprim (SDMT/TMP) were the
68 selected antibiotics for our study.

69 The purpose of this study was to assess the SDMT/TMP level in edible animal products after
70 pigs exposure to a mimed cross-contaminated feed. Plasma and tissue data were used to
71 develop a population pharmacokinetic model capable of predicting the contamination rate
72 that would not result in SDMT residues above the MRL. The potential presence of SDMT
73 metabolites was also studied, as the consumer may be at risk not only from the parent
74 compound but also the N-acetylated metabolite, which has been associated with renal toxicity
75 [23].

76 **3. Materials and methods**

77 **3.1. *In vivo* experimental study**

78 **3.1.1. Animals**

79 The animal study was approved by the French Committee on Animal Research and Ethics
80 (referral number: 21-035 #29960). This experimental study was conducted on eight pigs, as
81 pork is the most frequently consumed meat in Europe [24]. The animals were 8-week-old
82 female pigs weighing between 20.5 and 22.6 kg at the beginning of the study. They were all
83 housed in individual boxes and given non-medicated feed for an acclimation period of 7 days.
84 A central catheter was then implanted under general anaesthesia and aseptic conditions as
85 described elsewhere [25]. Briefly, pigs were first sedated with an IM injection of ketamine at
86 20 mg/kg (Imalgène, Merial, Lyon, France) and xylazine at 2 mg/kg (Rompun, Bayer, Loos,

87 France). After intubation, pigs were kept anesthetized by inhalation with isoflurane 2.5%
88 (IsoFlo, Zoetis, Malakoff, France). After surgical opening of the neck, a catheter was implanted
89 in one of the jugular vein. A recovery period of 24-48 h was allowed before the experiment
90 began.

91 The animals were fed using an organic non-medicated feed (UFAB, Lamballe-Armor, France)
92 and had unlimited access to water throughout the experiment. The feed composition is
93 presented in Supplementary Table 1.

94 **3.1.2. Drug administrations to mimic a cross-contaminated feeding**

95 The two antibiotics administered in combination were SDMT/TMP. From day 0 (D0), in order
96 to mimic a cross-contaminated feeding at a tolerable rate for French GMPs [10] of 2% of the
97 recommended therapeutic dose (i.e. 14.9 mg of SDMT/kg of feed and 3.2 mg of TMP/kg of
98 feed per day), SDMT/TMP premix combination (Trimethosulpha V, Dopharma, Vair-sur-Loire,
99 France) was used as follows:

100 - The total feed intake was of 50 g/kg body weight/day. The animals were weighed once a
101 week in order to adapt the feed quantity and the SDMT/TMP amounts to add in the
102 contaminated feed.

103 - The individual daily dose of premix was calculated (i.e. 0.75 mg/kg body weight for SDMT
104 and 0.16 mg/kg body weight for TMP) and split into two administrations at 8 a.m. and 4 p.m.
105 each day

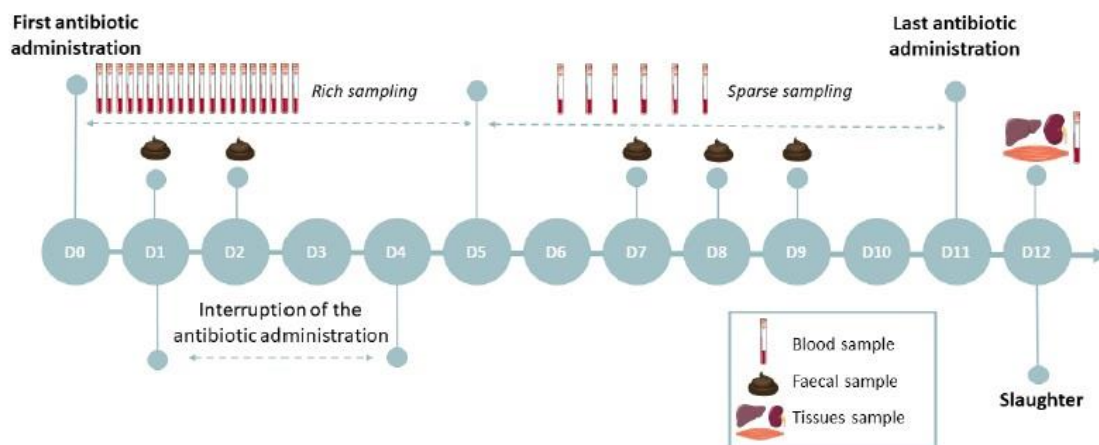
106 - To ensure that the whole antibiotic amounts were ingested, the premix was given first within
107 a small quantity of feed and the pigs were closely monitored before giving the animals the rest
108 of the (antibiotic-free) ration.

II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale

109 The antibiotics were administered for 12 days (from D0 to D11) except after the second
110 administration on D1 (i.e. after four administrations since initiation), when administration of
111 the antimicrobial was interrupted for two days and then restarted on D4 (see Figure 1). The
112 purpose of this temporary stoppage was to closely monitor the shape of the decrease in
113 plasma concentrations of SDMT/TMP so as to develop a robust PK model (see 3.4). Finally, the
114 animals were slaughtered by electronarcosis followed by exsanguination on D12 (i.e. between
115 17 and 19h after the last administration).

116 3.1.3. Blood, faecal and tissue samplings

117 From D0 to D4, 2 ml of blood were sampled 22 times for each animal (rich sampling). Then, in
118 order to verify that the plasma steady-state was eventually achieved, three to five samples
119 were collected from six out of the eight pigs from D5 until the end of the study (sparse
120 sampling) (see Figure 1). The blood samples were kept in heparinized tubes and centrifuged
121 (3000g for 10 min) within 60 min after sampling. Then, the plasma was collected and stored
122 at -18°C until analysis. During the study, individual faeces were also collected from the floor
123 between four and five times (between two and three times a week, see Figure 1) and stored
124 at -80°C for further analysis. The faecal and plasmatic sampling was done taking into account
125 ethical recommendations as well as data from a pilot study carried out previously [19]. The
126 slaughter of the animals allowed a last blood sample to be taken. Liver, kidney and muscle
127 samples from the loin and leg were also collected and stored at -80°C for liver and -18°C for
128 kidney and muscle, until analysis.



129
130

Figure 1. Timeline of the in vivo experiment with the sampling details

131 3.2. Sample preparation and analysis

132 3.2.1. Chemicals and reagents

133 Methanol for high-performance liquid chromatography, Optima liquid chromatography/mass
134 spectrometry grade methanol, ethylenediaminetetraacetic acid disodium dihydrate
135 (Na₂EDTA) and citric acid monohydrate were obtained from Fisher Scientific (Illkirch-
136 Graffenstaden, France). Formic acid and disodium hydrogen phosphate were purchased from
137 Merck (Fontenay-sous-Bois, France) and dimethyl sulfoxide (DMSO) from VWR (Fontenay-
138 sous-Bois, France). Standards of SDMT, TMP and trimethoprim-D9 were purchased from
139 Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and sulphadimethoxine-D6 from Cluzeau Info
140 Labo (Sainte-Foy-La-Grande, France).

141 3.2.2. Samples extraction

142 All samples were processed as described previously in order to extract and quantify SDMT and
143 TMP [19]. Briefly, after addition of SDMT-D6 and TMP-D9 as internal standards, liquid-liquid
144 or solid-liquid extraction with acetonitrile was used for plasma, liver, muscle and kidney
145 samples, followed by an evaporation under nitrogen and resuspension with water. For faeces,
146 after adding McIlvaine/EDTA buffer, a solid-phase extraction (SPE) was performed using water

147 for washing the columns and methanol for eluting the molecules. Finally, an evaporation
148 under nitrogen followed by resuspension in water was done.

149 **3.3. LC-MS/MS analysis for the quantification of SDMT and TMP**

150 Faeces, plasma, liver, kidney and muscle extracts were analysed by LC-MS/MS as previously
151 described [19] in order to quantify SDMT and TMP concentrations. The LC-MS/MS system
152 consisted of an Accela Pump and a Thermo Pal autosampler coupled with a TSQ Vantage triple
153 quadrupole mass spectrometer from Thermo Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). A Kinetex
154 Biphenyl column manufactured by Phenomenex (100 x 2.1 mm, 2.56 mm) was used for
155 chromatographic separation. An MRM acquisition mode was used to monitor specific
156 transitions of SDMT, TMP and internal standards. The lower limit of quantification (LLOQ) of
157 the method was 10 ng/ml or ng/g for plasma, liver, kidney and muscle (except for SDMT in
158 liver, for which it was 16.31 ng/g), and 20 ng/g for faeces. Calibration ranges and acceptance
159 criteria for each matrix are shown in Supplementary Table 2.

160 **3.4. Pharmacokinetic model development for SDMT**

161 **3.4.1. Modeling of plasma concentrations**

162 Monolix software (Lixoft, S. A. S. Monolix version 2021R2; Antony, France, 2021) was used to
163 develop the population PK model based on the plasma data for SDMT (not for TMP, see
164 section 4.2). First, different structural models (one or two compartments) were tested. The
165 estimation of inter-individual variability (IIV) was tested for each parameter. An additional
166 inter-occasion variability (IOV) was also tested, where one occasion corresponds to a new oral
167 administration, assuming that individual parameters may vary from occasion to occasion. Any
168 potential effect of body weight as a continuous covariate was then investigated for the

169 apparent clearance and volume. The full model for each structural parameter is described by
170 Equation 1.

$$\log(X_i) = \log(X_{\text{pop}}) + \beta_x \times \log(BW_i/23.5) + \eta_i + Y_{ik} \quad \text{Eq. (1)}$$

171 Where X_{pop} is the population value of parameter X, β_x : the covariate coefficient linked to
172 body weight (only if significantly different from 0), BW_i : individual body weight (the median
173 weight of pigs at the beginning was 23.5 kg); η_i is the random effect for individual I (for IIV),
174 Y_{ik} is the variability at the occasion level for each individual (for IOV).

175 Different error models were evaluated (additive, proportional or a mixture of both).

176 The final PK model was selected based on the Bayesian information criterion (BIC) value and
177 the goodness-of-fit graphs for observed and predicted data. The IIV, IOV and covariate values
178 were kept only if the precision of estimation (based on the relative standard error (RSE)) was
179 <50% and associated with a decrease in BIC. Visual predictive checks (VPCs) were used to
180 validate the model, with 500 simulations and a 90% prediction interval.

181 3.4.2. Prediction of edible tissue concentrations for SDMT

182 One goal of this work was to use the PK model to predict SDMT tissue concentrations after
183 exposure to food contaminated at a population level with different SDMT concentrations. For
184 that purpose, the ratio of tissue concentration over plasma concentration (named partition
185 coefficient, K_p) at the time of slaughter (on average 18 h after the last meal) was calculated
186 for each edible tissue (kidneys, muscle, liver), assuming that the concentration steady-state
187 was achieved. Monte Carlo simulations were then performed using Simulix software (Lixoft,
188 S.A.S. Simulix version 2021R2 Antony, France, 2021). Briefly, a virtual pig population ($n=1000$)
189 was generated based on the final population PK model to get the predicted distributions of

190 SDMT plasma concentrations. For tissues, a log-normal distribution was assumed for the
191 calculated Kps that was multiplied to the plasma concentrations at 18h after the last
192 administration (as in our experimental design) to get the predicted distributions of SDMT
193 concentration in each edible tissue. Two different scenarios of exposure to SDMT were used
194 in these simulations: 2% of the contamination rate (identical to the experimental design) and
195 1% of the contamination rate (corresponding to the regulatory tolerated maximum) for 12
196 days. Then, the maximum exposure scenario that would guarantee that tissue concentrations
197 would not exceed MRLs for 95% of pigs was determined.

198 **3.5. Seeking of SDMT metabolites by LC-HRMS**

199 Targeted and non-targeted LC-HRMS analyses were carried out in order to seek SDMT
200 metabolites in liver samples.

201 **3.5.1. Liver sample preparation**

202 In addition to the eight liver samples prepared for the pharmacokinetic and residue study, five
203 blank pig liver samples providing from animals of a pilot study were also extracted using the
204 same extraction as described previously. These non-treated animals were from the same
205 breeding as for the pharmacokinetic and residue study. These blank liver samples were used
206 as control samples for the non-targeted seeking of SDMT metabolites.

207 **3.5.2. LC-HRMS**

208 Both targeted and non-targeted approaches were performed on a system composed of an
209 Acquity H-class UPLC system coupled with a Vion IMS QTOF mass spectrometer manufactured
210 by Waters (Guyancourt, France). Compounds were separated with a Kinetex Biphenyl column
211 (100 x 2.1 mm, 2.56 mm) by Phenomenex (Le Pecq, France) protected by a C18 guard column

212 (4 mm x 2 mm) heated to 35°C. Mobile phases were 0.1% formic acid in water (A) and 0.1%
213 formic acid in methanol (B) with a flow rate of 0.3 ml/min.

214 Electrospray ionisation (ESI) in positive mode was used and the acquisition was performed in
215 MS^E mode, with a low collision energy of 6 eV and a high collision energy ranging from 15 eV
216 to 50 eV. The scan time was of 0.2 s and the mass range covered was from 50 m/z to 1200
217 m/z. Other source parameters were the desolvation temperature (550°C), the source
218 temperature (120°C), the capillary voltage (0.80 kV), the desolvation gas (800 L/h) and the
219 cone gas (50 L/h).

220 3.5.3. Targeted approach acquisition

221 The gradient for the targeted approach lasted 13 minutes. It started with 100% of A for 2
222 minutes, then 100% of B from minute 2 to minute 10, after which the composition was stable
223 until minute 11. Finally, at minute 11, the gradient returned to the initial conditions (100% of
224 A) and remained constant for two minutes.

225 There were two acquisitions in order to look for phase I and phase II metabolites. The targeted
226 compounds used to check acquisition quality are shown in Table 1. In addition to these three
227 compounds, 20 phase 1 and 20 phase 2 metabolites of SDMT were investigated and are listed
228 in Supplementary Table 3.

<i>Component</i>	<i>Adduct</i>	<i>Retention time (min)</i>	<i>m/z</i>
<i>Sulphadimethoxine</i>	[M+H] ⁺	7.88	311.0736
<i>Sulphadimethoxine-d6</i>	[M+H] ⁺	7.88	317.1112
<i>Trimethoprim</i>	[M+H] ⁺	6.18	291.1379

229 *Table 1. Targeted analytes for the targeted approach in HRMS analysis*

230

231

232 **3.5.4. Non-targeted approach acquisition**

233 For the non-targeted approach, the elution gradient was longer. It started with one minute at
234 100% of A, then 100% of B for 24 min, where it remained stable for over two minutes. Finally,
235 at minute 27, the gradient returned to the initial conditions (100% of A) and was constant until
236 minute 30.

237 The targeted adducts used to check acquisition quality were the same as for the targeted
238 approach (Table 1). In this approach, the order of sample injections was randomised to avoid
239 any bias linked to the analytical instrument. Furthermore, a quality control (QC), which was a
240 mixture of all the samples, was injected every five injections.

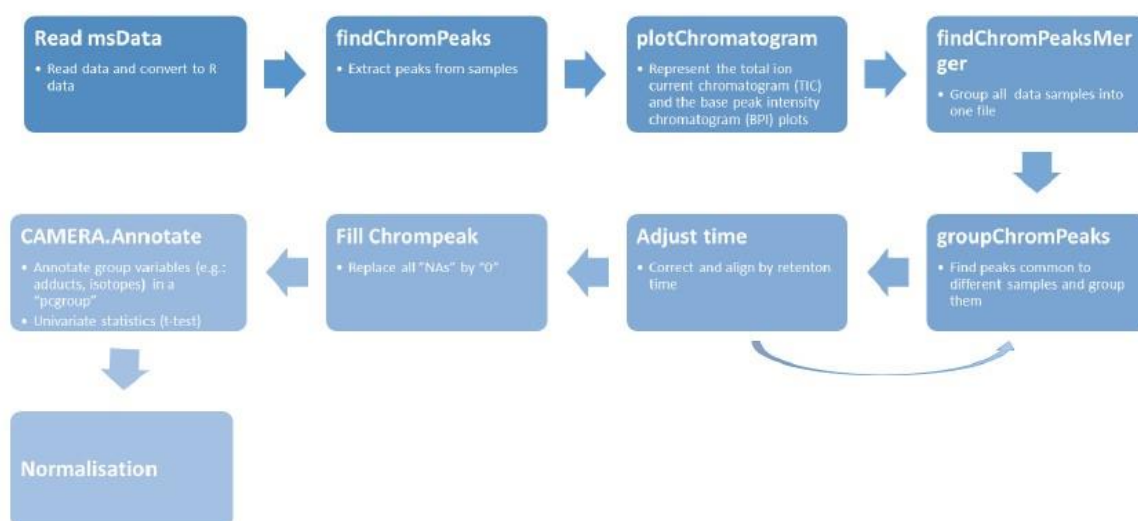
241 **3.6. Data analysis for the non-targeted research of SDMT metabolites**

242 Data processing and statistical analysis were performed with Workflow4Metabolomics (W4M)
243 on the Galaxy platform.

244 **3.6.1. Data processing workflow**

245 First of all, raw acquisition files were transformed to mzML format with MS-Convert software
246 (version 3.0). At this step, only the precursor ions were kept, even when an MS^E acquisition
247 mode was used. After uploading mzML files to W4M, there was a preprocessing step to first
248 extract the peaks from all chromatograms, then group similar peaks from different samples
249 and finally apply a correction to the retention time if needed. The goal was to obtain a variable
250 data table in which each feature is represented with its m/z mass, time retention and presence
251 in each group (treated, control or QC) in addition to a data matrix table containing the
252 intensities of all the features in each sample. Before starting the statistical analysis, there was
253 a normalisation step. This entailed applying a linear correction taking into account the

254 variation in signal intensities of the features (m/z associated with a retention time) in the QC
 255 over time. The detailed preprocessing and normalisation workflow is represented in Figure 2.



256

257 *Figure 2. Schematic workflow of data preprocessing and normalisation in Workflow4Metabolomics*
 258 *on the Galaxy platform*

259 3.6.2. Statistical analysis

260 First, a univariate analysis (t-test with FDR correction for multiple tests) was carried out to
 261 seek those variables with a significant ($P < 0.01$) difference in response between the control
 262 and the treated samples.

263 Multivariate analyses were then performed. A principal component analysis (PCA) was carried
 264 out after Pareto scaling of the variable in order to see if there was a different metabolomic
 265 profile in the liver of SDMT-treated pigs compared with control pigs. The goal was to see
 266 whether an unsupervised model with projection of the whole dataset according to two
 267 components was sufficient to highlight differences between the two groups at a first glance.

268 Secondly, a supervised partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) model was built
 269 taking into account the groups to which each of the samples belonged (treated or control) to
 270 create the orthogonal components. The PLS-DA was designed to reveal any differences in the

271 metabolomic profile of the two groups, as well as to identify which variables are more
272 important for group separation, necessary in the model's construction. Pareto scaling of the
273 data was used to provide the same scale for all variables. Model performance was determined
274 by R2Y and Q2Y, diagnostic statistics whose significance was then checked by permutation
275 tests.

276 **4. Results**

277 **4.1. Plasma analysis and PK model development**

278 **4.1.1. Plasma analysis**

279 Plasma concentrations of SDMT/TMP over time are shown in Supplementary Figure 1. After
280 the first two oral administrations of premix (D0-D1), the concentration of SDMT in plasma
281 increased to reach a maximum mean concentration of 2724.0 ± 561.2 ng/ml. For TMP, the
282 maximal concentrations were much lower (around 15 ng/mL, which is close to the LLOQ).

283 The premix feed intake was then replaced by antibiotic-free feed for two days to observe the
284 profile for decreasing concentrations (useful for developing the PK model, see section 4.2). On
285 D4, antibiotics were administered again and SDMT concentrations increased before remaining
286 relatively stable (steady-state reached) until the animals' slaughter (between 2124 and 4330
287 ng/ml).

288 For TMP, 60% of the samples were below the LLOQ of the analytical method (10 ng/ml) (but
289 above the LOD), which means that the measurements are subject to great uncertainty.

290 **4.1.2. PK model development**

291 For TMP, no PK model was developed due to the high proportion of samples (60%) being
292 below the LLOQ.

293 Regarding SDMT, a one-compartment model was finally selected based on a decrease BIC (the
 294 lower being the better). The corresponding structural parameters were apparent clearance
 295 (Cl/F), apparent volume (V/F) (apparent because only the oral route was used in this PK study),
 296 and absorption rate (ka). Parameters of the final model are presented in Table 2. IIV and IOV
 297 could be estimated for ka and apparent clearance. Moreover, a low but significant relationship
 298 was found between the covariate body weight and clearance (with $\beta_{Cl_{WT}} = 0.18$).

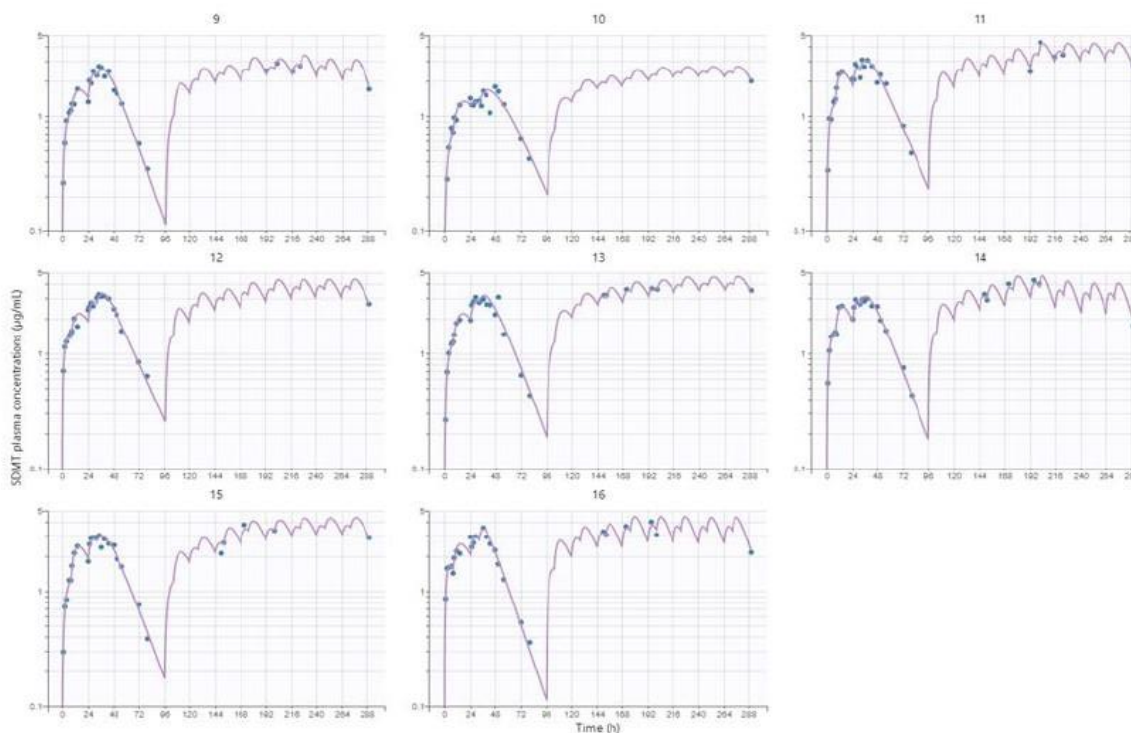
Parameters	Fixed Effects	
	VALUE	R.S.E. (%)
ka (h ⁻¹)	0.18	20.4
V/F (L)	4.35	5.30
Cl/F (L/h)	0.24	5.01
beta_Cl _{WT}	0.18	4.94
Parameters	<i>inter-individual variability</i>	
	Value as CV (%)	R.S.E. (%)
η_{ka}	46.6	34.0
η_{Cl}	12.8	31.8
Parameters	<i>IOV: inter-occasion variability</i>	
	Value as CV (%)	R.S.E. (%)
Υ_{ka}	33.4	19.9
Υ_{Cl}	11.4	24.0
Error Model Parameters		
a (µg/mL)	0.059	23.4
b (%)	0.11	7.76

299 Table 2: Estimated parameter values from the final population PK model Cl/F : apparent clearance ; ,
 300 V/F : apparent volume; ka : absorption rate. a : additive error component; b: proportional error
 301 component: , RSE: relative standard error

II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale

302 The graph of individual fits (Fig 2) shows that the model was able to adequately describe the
303 observed data. The plasma steady-state was obtained from D8 (i.e. around 72 h after the
304 resumption of treatment).

305 The elimination half-life was calculated from the PK parameters to be equal to 12.5 +/- 1.3 h.



306

307 *Figure 3: Individual fits of SDMT plasma concentrations. The blue points are the observed data and*
308 *the purple line is the model's prediction.*

309 The graphs of VPC (Supplementary Figure 2) showed some bias at the late time points but no
310 major bias, so the population pharmacokinetic (popPK) model was validated.

311 4.2. Tissue and faecal samples analysis

312 SDMT and TMP concentrations in tissues and the corresponding MRLs and Kp are shown in
313 Table 3.

<i>Matrix</i>	Antibiotic (MRL in µg/kg)	Mean concentration ± standard deviation (µg/kg)	Mean tissue-plasma partition coefficient (Kp) ± standard deviation
<i>Muscle (mean of loin and leg)</i>	SDMT (100)	187.36 ± 24.6	0.081 ± 0.018
	TMP (50)	<LLOQ*	NC
<i>Liver</i>	SDMT (100)	617.93 ± 95.6	0.27 ± 0.076
	TMP (50)	<LLOQ*	NC
<i>Kidney (mean of both left and right kidneys)</i>	SDMT (100)	509.85 ± 72.5	0.22 ± 0.076
	TMP (50)	18.9 ± 10.05	NC

314 *LLOQ: lower limit of quantification. NC: not calculated

315 *Table 3. Concentrations of sulphadimethoxine and trimethoprim in pig tissues at time of slaughter,*
316 *along with the corresponding MRLs and Kp*

317

318 At an administration concentration corresponding to 2% of the therapeutic dose, SDMT
319 concentrations in all tissues after 12 days of exposure were higher than the MRLs allowed by
320 European legislation, especially in the liver and kidney. The individual results (SDMT tissue and
321 plasma concentrations at slaughter as per pig) are presented in Supplementary Table 4.

322 On the other hand, TMP concentrations were below the lower limit of quantification (LLOQ)
323 of the method in all matrices except kidney samples, where concentrations were quantifiable
324 but remained below the MRL.

325 The mean faecal concentrations are presented in Table 4. While TMP was not detected in
326 faeces, SDMT concentrations were constant after day 2 of the study, being between 600 and
327 750 µg/kg during the whole experiment.

328

II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale

<i>Day</i>	<i>Antibiotic</i>	<i>Mean concentration ± standard deviation (µg/kg)</i>
<i>Day 1</i>	SDMT	446.53 ± 107.2
<i>(n=8)</i>	TMP	ND
<i>Day 2</i>	SDMT	714.76 ± 105.1
<i>(n=8)</i>	TMP	ND
<i>Day 7</i>	SDMT	628.98 ± 25.9
<i>(n=4)</i>	TMP	ND
<i>Day 8</i>	SDMT	677.03 ± 71.5
<i>(n=8)</i>	TMP	ND
<i>Day 9</i>	SDMT	749.59 ± 117.8
<i>(n=8)</i>	TMP	ND

329 *Table 4. Concentrations of sulphadimethoxine and trimethoprim in pig faecal samples. ND = Not*
 330 *Detected*

331 4.3. Simulations based on PK model

332 Monte Carlo simulations (n=1000) were then carried out based on the popPK model for
 333 plasma and the calculated partition coefficients (Kp) in each tissue to predict the
 334 concentrations of SDMT in edible tissue according to various exposure scenarios (see Table 5).
 335 For all the simulations, the tissue concentrations was predicted 18h after the last
 336 contaminated feed as in our experimental design.

<i>Scenario</i>	<i>Liver</i>	<i>Muscle</i>	<i>Kidney concentrations</i>
	<i>concentrations</i>	<i>concentrations</i>	
<i>2% contamination</i>	577 [305-1085]	181 [102 - 317]	486 [254 - 917]
<i>rate for 12 days</i>			
<i>1% contamination</i>	295 [161 - 518]	92 [50 - 155]	244 [127- 484]
<i>rate for 12 days</i>			

337 *Table 5: Simulated SDMT concentrations in edible tissues according to different scenarios 18 h after*
 338 *the last administration. The median concentrations and [5th-95th] percentiles are given*

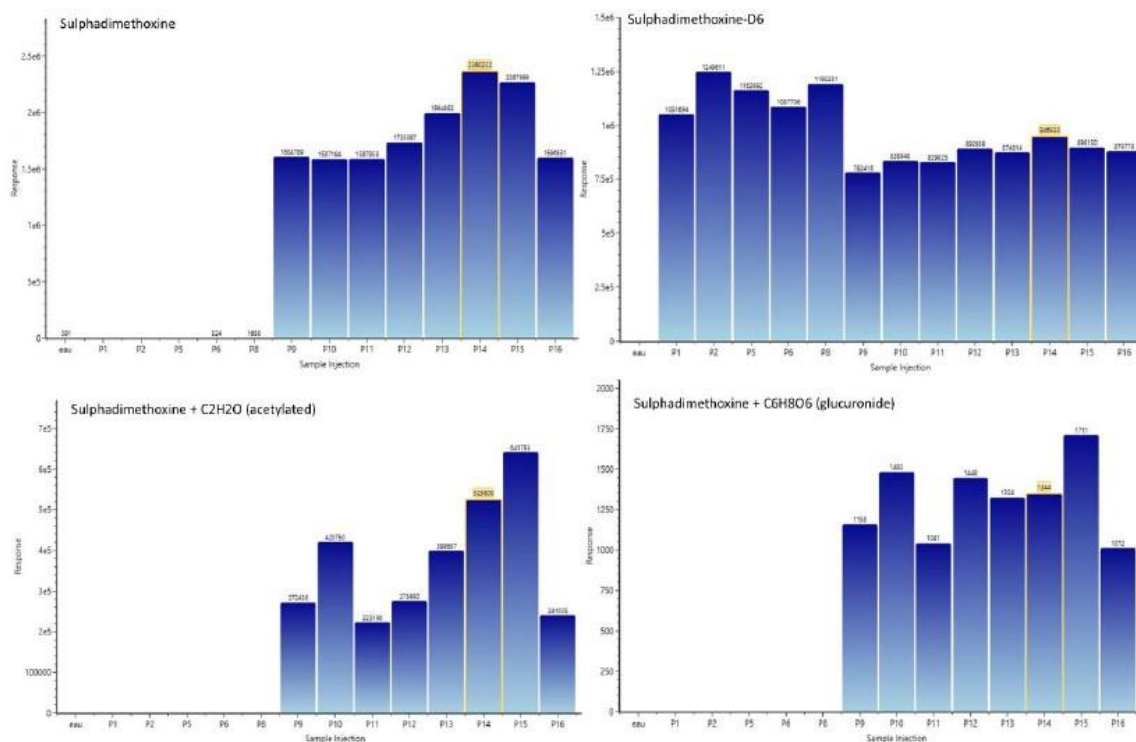
339 These simulations highlighted that with a scenario of a 2% contamination rate, 95% of the pigs
340 would have SDMT tissue concentrations above the MRL (100 µg/kg) in all edible tissues.
341 Similar results applied to the scenario with a 1% contamination rate, except for muscles, for
342 which at least 50% of pigs would have tissue levels under the MRL.
343 Based on the edible tissue with the highest SDMT concentrations in our experiment (liver) and
344 assuming that the PK of SDMT is linear, the contamination rate which ensures that 95% of pigs
345 will have liver concentrations below the MRL was calculated to be around 0.2% of the
346 therapeutic dosage.

347 **4.4. HRMS analysis and research of metabolites**

348 **4.4.1. Targeted approach**

349 Two phase II metabolites of SDMT were found after targeted HRMS analysis. First, the
350 potential acetylated metabolite was detected at a mean retention time of 8.15 min in all
351 samples from the treated pigs, but not from the control ones. In addition, the glucuronide
352 metabolite was also detected with a low-intensity signal. For this putative metabolite, a split
353 peak was observed (at 6.97 and 7.06 min), which could be two isomer forms of the metabolite,
354 as this type of isomerisation of glucuronide conjugates is described in the literature (but not
355 described in pigs) [26, 27]. The results shown in this article are those corresponding to the first
356 peak. The responses of SDMT, SDMT-D6 and both putative metabolites across the samples are
357 shown in Figure 4. Table 6 describes the observed m/z as well as the mean retention time for
358 each of the metabolites.

II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale



359

360 *Figure 4. Sulphadimethoxine, sulphadimethoxine-d6,) sulphadimethoxine+C6H8O6 (glucuronide) and*
 361 *sulphadimethoxine+C2H2O (acetylated) responses in water (eau), control livers (P1, P2, P5, P6 and*
 362 *P8) and treated pig livers (P9-P16)*

363

<i>Putative metabolite</i>	<i>Observed m/z</i>	<i>Range of mass error (ppm)</i>	<i>Observed retention time</i>	
			<i>(min, mean across the samples)</i>	<i>Adduct</i>
<i>Sulphadimethoxine + C2H2O (acetylated)</i>	353.092	-0.3 – 0.9	8.15	[M+H] ⁺
<i>Sulphadimethoxine + C6H8O6 (glucuronide)</i>	487.115	0.3 – 14	6.97	[M+H] ⁺

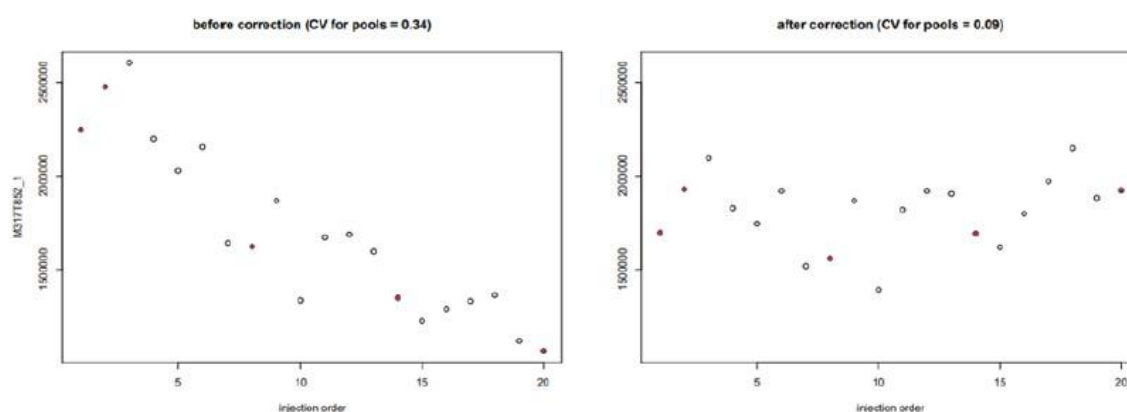
364

Table 6. Observed mass and retention time for putative SDMT metabolites in liver

365

366 **4.4.2. Non-targeted approach**367 **Normalisation and quality of the data**

368 Some variables were subjected to linear normalisation because of a decrease in their signal
369 intensity in QCs over time. Whether or not this correction was applied depended on the
370 workflow developed by Van de Kloet [28]. A filter was applied to eliminate variables with a
371 high coefficient of variation (CV) in their responses. This filter was set at 35% in order not to
372 lose the SDMT, whose CV was of 33%. Data quality was also checked using some of the
373 parameters from the internal standard (SDMT-D6), such as a constant retention time ($14.19 \pm$
374 0.01 min) and the CV of the response over the batch before and after normalisation (from 34%
375 to 9%, see Figure 5).



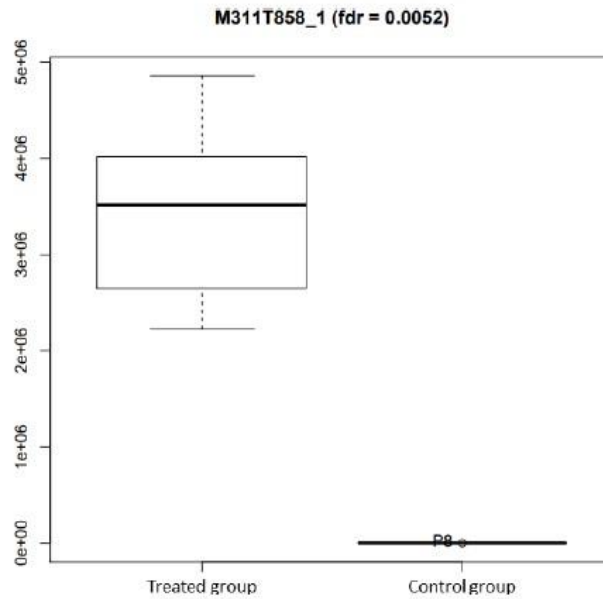
376

377 *Figure 5. Coefficient of variation in the internal standard (sulphadimethoxine-d6) response before and*
378 *after normalisation.*

379 **Univariate analysis**

380 The univariate analysis selected a total of 100 variables for which the response showed a
381 significant difference between the two groups ($p < 0.01$). Both SDMT and the potassium adduct
382 (SDMT+K) were found among these first 100 variables, but neither the acetylated or the
383 glucuronide metabolites were.

II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale



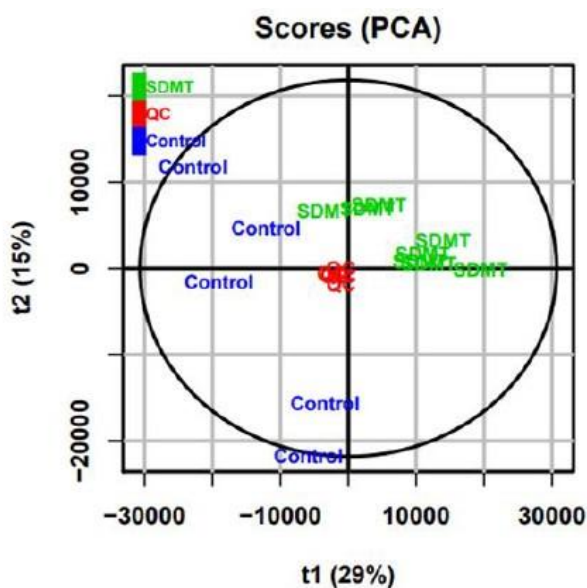
384

385

Figure 6. Univariate analysis result for sulphadimethoxine

386 Multivariate analysis

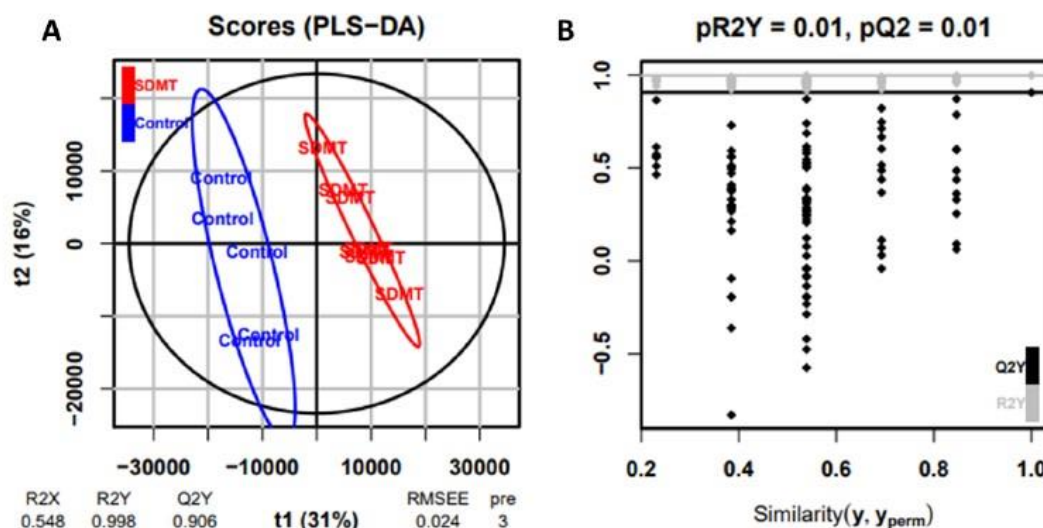
387 A first multivariate descriptive analysis was performed by doing a PCA. The goal was to see if
388 patterns were observable in the projection of samples over the different components. As
389 shown in Figure 7, clustering is clearly observed over the two main components and all the
390 QCs are in the centre of the projection, demonstrating the contribution of normalisation. Up
391 to 44 % of the data set's variability is taken into account in this model.



392

393 *Figure 7. PCA scores for components 1 and 2 with identification of the samples according to group*

394 A PLS-DA model was then constructed in order to better visualise any possible difference in
395 the metabolomic profile between the two groups and to look for potential metabolites
396 involved in this differentiation. The model's performance was assessed by evaluating different
397 parameters. Firstly, R2Y —which is the percentage of variable Y (belonging to the treated or
398 control group) explained by the model— was of 0.998. Next, Q2Y — which is the predictive
399 capacity of the model —was of 0.906 (see Figure 8). Permutation tests were carried out to
400 evaluate whether the model was overfitted or not. The proportion of times that the R2Y and
401 Q2Y values obtained in the permutation tests were better than the original ones was
402 calculated and p-values for both diagnostic parameters (pR2Y and pQ2Y) were of 0.01 (see
403 Figure 8), which means that the diagnostic parameters are significant and that the model was
404 valid. With this analysis, a difference between both groups is also observed over the first
405 component of the PLS-DA model.



406

407 *Figure 8. PLS-DA score plot for components 1 and 2 (A) and results of the permutation tests (B)*

408 Furthermore, the PLS-DA analysis provided a features table where the variables were sorted
 409 according to their “variable importance projection” (VIP) score, which is a way of ranking the
 410 variables according to their contribution to group differentiation, thus used to create the
 411 model. In this analysis, the SDMT was in ninth place but none of the putative SDMT
 412 metabolites detected by the targeted approach was found by the non-targeted approach.

413 5. Discussion

414 The plasma PK profile was in good agreement with previous publications [22, 29]. The
 415 development of a population PK model based on plasma was successful for SDMT due to its
 416 rich sampling design. It was not possible for TMP due to many data being below the LLOQ.
 417 Regarding SDMT, the popPK model was able to quantify IIV and IOV for two parameters with
 418 very good confidence (Table 2): the oral absorption constant (k_a) and apparent clearance
 419 (Cl/F). The variability for apparent clearance actually represents both the variability of
 420 clearance and that of bioavailability (F), because F is embedded in this parameter. Indeed, to
 421 compute the absolute bioavailability we would need IV data.

422 A major result of this study is that even at low contamination rates tolerated by the current
423 French GMPs, residues of SDMT could be present in edible products at levels far above the
424 MRL (5 or 6 times higher, see Table 3). Furthermore, as this type of exposure of animals is
425 likely to be undetected on farms, there is no compliance with the withdrawal period and
426 consumers could be directly exposed to antimicrobial residues. TMP concentrations were only
427 quantifiable in the kidney, but remained below the MRL.

428 The tissues/plasma ratios (K_p) for SDMT calculated at the end of the study were similar to
429 those found previously in the literature [30], i.e. between 0.2 and 0.3 for kidney/liver and
430 around 0.1 for muscles. This highlights a relatively poor affinity of SDMT with these tissues.
431 We used the popPK model with the calculated K_p values to simulate and predict the
432 concentrations of SDMT at a population level using various exposure scenarios . Globally, our
433 simulations showed that in order to avoid SDMT residues higher than the MRL, the
434 contamination rate should not exceed 0.2%. This value could be compared with the
435 contamination limits fixed in French GMPs that establish a 5% contamination rate for the first
436 non-medicated feed following a medicated one, and 1% for the following batches [10].
437 However, these simulations are based on K_p ratios that were calculated for a specific time (i.e
438 18h) after the last antibiotic administration, which may be a limit of the model. Indeed,
439 because there are no kinetic knowledge for tissues (i.e the elimination half-life), simulations
440 are subject to some uncertainty. Furthermore, our animal study was carried out on piglets,
441 which means that PK parameters could be very different for bigger and older animals.
442 Therefore, the simulation results should be considered carefully, as should extrapolation to
443 pigs having reached the market weight for slaughter.

444 The SDMT was a good choice for this study because of its relatively long half-life (around 13h),
445 which increases the risk of accumulation in tissues when administered on a daily basis.
446 However, these results should not be extrapolated to other sulphonamides with different
447 pharmacokinetic parameters. Concentrations of SDMT were relatively low in faeces (between
448 0.6 and 0.7 µg/g of faeces), which is in agreement with the available literature that reported
449 good oral absorption of this drug [31]. Nevertheless, these low levels of concentrations
450 coupled with a chronic exposure (several weeks) could be a risk of antibiotic resistance in gut
451 commensal bacteria. Indeed, in our recent experimental study that mimicked a cross-
452 contaminated exposure with another antibiotic (oxytetracycline), a significant increase of the
453 proportion of resistant *E.coli* was observed at the end of the study [32].

454 The targeted approach of the HRMS analysis revealed two phase II metabolites. First, the
455 acetylated metabolite, which has already been described *in vitro* in pig hepatocytes [33] and
456 *in vivo* in pig plasma and urine [22, 34]. Therefore, at the tolerated contamination rates, it is
457 not only SDMT residues that could be present in edible products but also its metabolites,
458 which may be harmful for consumers. For instance, the acetylated metabolite has been shown
459 to be related to renal toxicity because of its precipitation in the kidney [23]. Furthermore, the
460 glucuronide metabolite was potentially found but due to the low-intensity signal, this needs
461 to be investigated in a further study involving higher doses of SDMT. To our knowledge, this
462 metabolite has never been reported in pig livers, although it has been described in the urine
463 of humans [35, 36], primates, rats, dogs, mice and guinea pigs [37, 38].

464 For the non-targeted approach, a PCA model was first developed that revealed a difference
465 between the treated and control groups in the metabolic profile of the liver. The PLS-DA model
466 then confirmed this clustering and allowed those features most involved in this clustering to

467 be selected. The results of the univariate and multivariate analysis showed the most important
468 variables involved in the differentiation of the groups. SDMT and one of its adducts were
469 found among these variables, but not the two putative SDMT metabolites detected during the
470 targeted approach. However, some potentially interesting features were observed that could
471 be further investigated in future studies. Nevertheless, the goal of this study was to identify
472 metabolites of SDMT. When seeking xenobiotic metabolites our study clearly demonstrated
473 that the targeted approach is more suitable than the non-targeted approach, which makes
474 the search very difficult and time-consuming due to the great number of ions. Furthermore,
475 some important metabolites may be lost due to the normalisation and filtering. For example,
476 the CV of the SDMT response was 33% (because the SDMT was not normalised by the
477 algorithm). This means that if a filter of 30% had been chosen, this molecule would not have
478 been found. What is more, the low SDMT concentrations, and thus the low concentrations of
479 its metabolites, makes it difficult to highlight them relative to the control group.

480 In conclusion, this study aimed to evaluate level of antimicrobial residues in edible products
481 of animal origin after exposure to contaminated feed. The results showed that, at the
482 tolerated cross-contamination rates (in France), SDMT concentrations higher than the
483 authorised MRL could be found in the muscle, liver and kidney. Furthermore, putative
484 metabolites of SDMT may be present in the liver, although further studies are needed to clarify
485 this risk. In the case of sulphonamides, MRLs were established for the whole class of veterinary
486 medicinal products as an extrapolation from studies performed with sulphadimidine alone
487 [39]. Further studies should be carried out in order to improve our knowledge of these drugs
488 and specifically to check initial assumptions of pharmacokinetic similarities between
489 sulphonamides.

490 Acknowledgements

491 The authors would like to thank Charlotte Valentin, Jérôme Henri and Jérôme Blot for their
492 help and support.

493 Declaration of Competing Interests

494 The authors declare that they have no competing interests.

495 References

- 496 1. EMA, *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021*. 2022.
- 497 2. Regulation (EU) 2019/4 of the European Parliament and of the Council of 11 December
498 2018 on the manufacture, placing on the market and use of medicated feed, amending
499 Regulation (EC) No 183/2005 of the European Parliament and of the Council and
500 repealing Council Directive 90/167/EEC. 2018
- 501 3. Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Pérez-Vendrell, A.M., Brufau, J.,
502 Medina, M., and Bosch, J., *Analysis of antimicrobial agents in animal feed*. Trends Anal.
503 Chem., 2011. **30**(7): p. 1042-1064.
- 504 4. Stolker, A.A., Manti, V., Zuidema, T., van Egmond, H., Deckers, E.R., Herbes, R.,
505 Hooglugt, J., Olde Heuvel, E., and de Jong, J., *Carry-over of veterinary drugs from*
506 *medicated to non-medicated feeds in commercial feed manufacturing plants*. Food
507 Additives and Contaminants Part A, 2013. **30**(6): p. 1100-7.
- 508 5. Robert, C., Brasseur, P.Y., Dubois, M., Delahaut, P., and Gillard, N., *Development and*
509 *validation of rapid multiresidue and multi-class analysis for antibiotics and*
510 *anthelmintics in feed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to*
511 *tandem mass spectrometry*. Food Additives and Contaminants Part A 2016. **33**(8): p.
512 1312-23.
- 513 6. Przeniosło-Siwczyńska, M., Patyra, E., Grelik, A., Chyłek-Purchała, M., Kozak, B., and
514 Kwiatek, K., *Contamination of Animal Feed with Undeclared Tetracyclines-*
515 *Confirmatory Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry after*
516 *Microbiological Plate Test*. Molecules, 2020. **25**(9).

- 517 7. Lynas, L., Currie, D., McCaughey, W.J., McEvoy, J.D.G., and Kennedy, D.G.,
 518 *Contamination of animal feedingstuffs with undeclared antimicrobial additives*. Food
 519 Additives & Contaminants, 1998. **15**(2): p. 162-170.
- 520 8. Gaugain, M., Fourmond, M.P., Fuselier, R., Verdon, E., Roudaut, B., and Pessel, D.,
 521 *Control of Antimicrobials in Feed Using Liquid Chromatography-Tandem Mass*
 522 *Spectrometry: Assessment of Cross-Contamination Rates at the Farm Level*. J Agric
 523 Food Chem, 2020. **68**(34): p. 9033-9042.
- 524 9. Filippitzi, M.E., Sarrazin, S., Imberechts, H., Smet, A., and Dewulf, J., *Risk of cross-*
 525 *contamination due to the use of antimicrobial medicated feed throughout the trail of*
 526 *feed from the feed mill to the farm*. Food Additives and Contaminants Part A 2016.
 527 **33**(4): p. 644-55.
- 528 10. French Ministry of Agriculture and Fisheries, *Décision du 12 février 2007 relative aux*
 529 *bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments*
 530 *médicamenteux*. 2007, Journal Officiel de la République Française.
- 531 11. McEvoy, J.D.G., *Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food:*
 532 *a review of regulatory aspects, incidence and control*. Anal. Chim. Acta, 2002. **473**: p.
 533 3-26.
- 534 12. Holman, D.B. and Chénier, M.R., *Impact of subtherapeutic administration of tylosin and*
 535 *chlortetracycline on antimicrobial resistance in farrow-to-finish swine*. FEMS Microbiol
 536 Ecol, 2013. **85**(1): p. 1-13.
- 537 13. Sandegren, L., *Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations*.
 538 Ups. J. Med. Sci., 2014. **119**(2): p. 103-7.
- 539 14. Bacanlı, M. and Başaran, N., *Importance of antibiotic residues in animal food*. Food
 540 Chem Toxicol, 2019. **125**: p. 462-466.
- 541 15. Marshall, B.M. and Levy, S.B., *Food animals and antimicrobials: impacts on human*
 542 *health*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(4): p. 718-33.
- 543 16. Baynes, R.E., Dedonder, K., Kissell, L., Mzyk, D., Marmulak, T., Smith, G., Tell, L.,
 544 Gehring, R., Davis, J., and Riviere, J.E., *Health concerns and management of select*
 545 *veterinary drug residues*. Food and Chemical Toxicology, 2016. **88**: p. 112-122.
- 546 17. Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May
 547 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of
 548 pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council

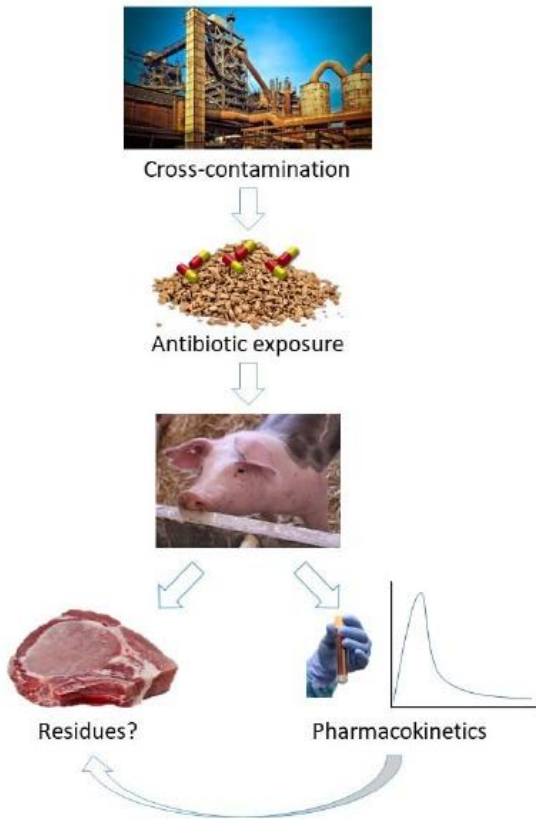
- 549 Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European
550 Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European
551 Parliament and of the Council 2009
- 552 18. Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December
553 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. 2019.
- 554 19. Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., Hurtaud-Pessel, D.,
555 Laurentie, M., Viel, A., Taillandier, J.-F., Lagree, M.-P., and Gaugain, M., *Validation of a*
556 *LC-MS/MS method for the quantitative analysis of four antibiotics in pig tissues and*
557 *plasma to assess the risk of transfer of residues to edible matrices after exposure to*
558 *cross-contaminated feed.* Food Additives & Contaminants: Part A, 2022. 39(11): p.
559 1818-1827.
- 560 20. EMA, *Categorisation of antibiotics in the European Union.* 2019.
- 561 21. Prescott, J.F., *Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations,* in
562 *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine,* J.F.P. Steeve Giguère, Patricia M.
563 Dowling, Editor. 2013.
- 564 22. M.J.B. Mengelers, E.R.v.G., M.B.M. Huveneers, P.E. Hougee, H.A. Kuiper, A. Pijpers,
565 J.H.M. Verheijden and A.S.J.P.A.M. van Miert, *Pharmacokinetics of Sulfadimethoxine*
566 *and Sulfamethoxazole in Combination with Trimethoprim after Oral Single- and*
567 *Multiple-Dose Administration to Healthy Pigs.* Veterinary Research Communications,
568 2001. 25: p. 461-481.
- 569 23. Kishida, K. and Furusawa, N., *Application of shielded column liquid chromatography for*
570 *determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and their N4-acetyl*
571 *metabolites in milk.* J Chromatogr A, 2004. 1028(1): p. 175-7.
- 572 24. OECD, Food, and Nations, A.O.o.t.U., *OECD-FAO Agricultural Outlook (Edition 2020).*
573 2020.
- 574 25. Viel, A., Nouichi, A., Le Van Suu, M., Rolland, J.G., Sanders, P., Laurentie, M., Manceau,
575 J., and Henri, J., *PBPK Model To Predict Marbofloxacin Distribution in Edible Tissues and*
576 *Intestinal Exposure in Pigs.* J Agric Food Chem, 2023. 71(10): p. 4358-4370.
- 577 26. Kong, J.Y., Yu, Z., Easton, M.W., Niyonsaba, E., Ma, X., Yerabolu, R., Sheng, H., Jarrell,
578 T.M., Zhang, Z., Ghosh, A.K., and Kenttämää, H.I., *Differentiating Isomeric*
579 *Deprotonated Glucuronide Drug Metabolites via Ion/Molecule Reactions in Tandem*
580 *Mass Spectrometry.* Anal Chem, 2018. 90(15): p. 9426-9433.

- 581 27. Mitchell, D.G., Christopher, D.K., Behnaz, M., Peter, I.M., and Thomas, R.T.,
 582 *Glucuronidation of Amines and Other Xenobiotics Catalyzed by Expressed Human UDP-*
 583 *Glucuronosyltransferase 1A3*. Drug Metabolism and Disposition, 1998. 26(6): p. 507.
- 584 28. van der Kloet, F.M., Bobeldijk, I., Verheij, E.R., and Jellema, R.H., *Analytical Error*
 585 *Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic*
 586 *Phenotyping*. Journal of Proteome Research, 2009. 8(11): p. 5132-5141.
- 587 29. Mengelers, M.J., Kuiper, H.A., Pijpers, A., Verheijden, J.H., and van Miert, A.S.,
 588 *Prevention of pleuropneumonia in pigs by in-feed medication with sulphadimethoxine*
 589 *and sulphamethoxazole in combination with trimethoprim*. Vet Q, 2000. 22(3): p. 157-
 590 62.
- 591 30. Righter, H.F., Showalter, D.H., and Teske, R.H., *Pharmacokinetic study of*
 592 *sulfadimethoxine depletion in suckling and growing pigs*. Am J Vet Res, 1979. 40(5): p.
 593 713-5.
- 594 31. Linkenheimer, W.H., Stolzenberg, M.S., *Pharmacologic Characteristics of 4*
 595 *Sulfonamides in Swine*. American Journal of Veterinary Research, 1965. 26(114): p.
 596 1086-1094.
- 597 32. Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Gaugain, M., Viel, A., Paboeuf, F., Taillandier,
 598 J.F., Houée, P., Valentin, C., and Perrin-Guyomard, A., *Selection of antibiotic resistance*
 599 *in pigs after exposure to feed cross-contaminated with oxytetracycline*. Vet Microbiol,
 600 2023. 287: p. 109924.
- 601 33. M.J.B. Mengellers, G.A.K., L.A.P. Hoogenboom, H.A. Kuiper & A.S.J.P.A.M. Van Miert,
 602 *The biotransformation of sulfadimethoxine, sulfadimidine, sulfamethoxazole,*
 603 *trimethoprim and aditoprim by primary cultures of pig hepatocytes*. 1996.
- 604 34. Shimoda, M., Vree, T.B., Beneken Kolmer, E.W., and Arts, T.H., *The role of plasma*
 605 *protein binding on the metabolism and renal excretion of sulphadimethoxine and its*
 606 *metabolite N4-acetylsulphadimethoxine in pigs*. Vet Q, 1990. 12(2): p. 87-97.
- 607 35. Vree, T.B., Beneken Kolmer, E.W., and Peeters, A., *Comparison of the metabolism of*
 608 *four sulphonamides between humans and pigs*. Vet Q, 1991. 13(4): p. 236-40.
- 609 36. Vree, T.B., *Pharmacokinetics, N1-glucuronidation and N4-acetylation of*
 610 *sulfadimethoxine in man*. Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition, 1990. 12(2).

II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale

- 611 37. Adamson, R.H., Bridges, J.W., Kibby, M.R., Walker, S.R., and Williams, R.T., *The fate of*
612 *sulphadimethoxine in primates compared with other species*. *Biochem J*, 1970. **118**(1):
613 p. 41-5.
- 614 38. Bridges, J.W., Kibby, M.R., Walker, S.R., and Williams, R.T., *Species differences in the*
615 *metabolism of sulphadimethoxine*. *Biochem J*, 1968. **109**(5): p. 851-6.
- 616 39. EMA, *Committee for veterinary medicinal products. Sulphonamides*. 1995.

617 Graphic abstract



618

2. Etude sur l'oxytétracycline

Introduction

Une étude animale similaire à celle présentée dans le point précédent a été menée avec l'oxytétracycline. L'objectif était d'étudier, comme pour l'étude de l'association SDMT/TMP, le risque de présence de résidus dans les denrées d'origine animale avec une molécule fréquemment utilisée en prémélange médicamenteux et retrouvée lors des plans de surveillance, mais appartenant à une autre famille antibiotique et donc, possédant des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques différentes.

Méthodologie

Pour cette étude, 10 porcs (femelles, 8 semaines, entre 15,2 et 22,5 kg à l'arrivée) ont été placés dans des boxes individuels et ont reçu pendant une semaine une alimentation sans antibiotique, afin de respecter la période d'acclimatation. Un cathéter a été implanté sous anesthésie générale à l'aide d'un échographe sur 8 des 10 porcs. Une période de repos de 3 à 5 jours après l'opération a été respectée.

Pendant l'étude, les 10 animaux ont reçu une alimentation contaminée avec l'oxytétracycline (OTC-40, Huvepharma, Segré-en-Anjou Bleu, France) à 2% de la dose posologique (i.e. 20 mg OTC/kg aliment ou 1 mg OTC/kg poids vif). La ration alimentaire était de 50 g/kg poids vif/jour et, afin d'adapter la quantité d'aliment et la dose d'antibiotique, les animaux étaient pesés une fois par semaine. L'administration était répartie en deux repas (un le matin et un autre l'après-midi) et le traitement a duré de J0 à J11. A J1 la deuxième dose d'antibiotique n'a pas été administrée et le traitement a été repris au J2 le matin. Le but de l'arrêt du traitement était de suivre la diminution de la concentration plasmatique.

Des prélèvements fréquents de plasma (entre 6 et 10 par jour) ont été réalisés entre J0 et J1, le nombre pouvant varier en fonction des porcs et du bon fonctionnement de leur cathéter. Puis, entre J2 et J11 l'échantillonnage a été plus dispersé (entre 2 et 20 échantillons sur cette période). A J11 les 10 animaux ont été abattus et un échantillon de plasma a été récupéré, ainsi que les tissus (muscle, foie et rein). De même, les fèces ont été prélevées 4 fois pendant la durée du traitement sur l'ensemble des animaux.

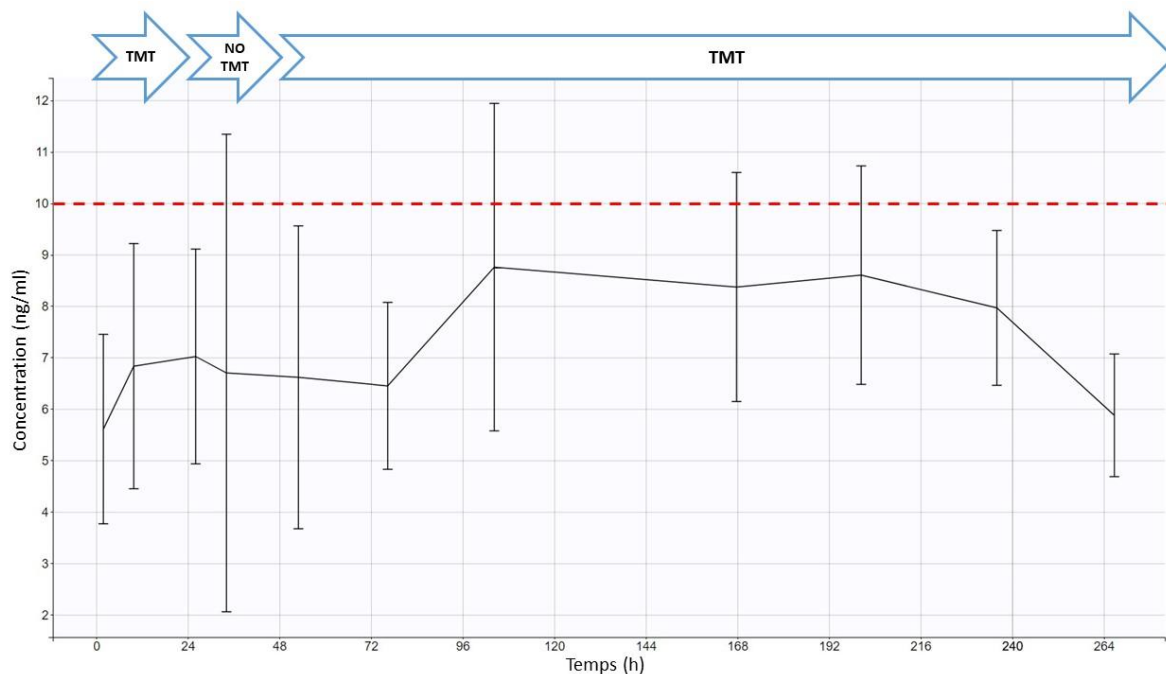
II- Evaluation du risque de transfert de résidus d'antibiotiques vers les denrées d'origine animale

Les échantillons de plasma, muscle et rein ont été conservés à -20°C et ceux de fèces et foie à -80°C jusqu'à l'analyse.

Tous les échantillons ont été analysés par LC-MS/MS avec les méthodes développées et validées préalablement [146].

Résultats

Les dosages plasmatiques ont montré qu'environ 88% des échantillons se retrouvaient en dessous de la limite de quantification de la méthode (10 ng/ml), ce qui a rendu impossible le développement d'un modèle pharmacocinétique (figure 43).



TMT = traitement No TMT = sans traitement

Figure 43. Données plasmatiques de l'oxytétracycline. La ligne rouge représente la LLOQ de la méthode

Les données tissulaires, qui sont présentées dans le tableau 7, restaient en dessous de la LMR pour toutes les matrices. Finalement, la concentration fécale moyenne retrouvée pendant toute la durée de l'étude était de $6050,38 \pm 700.7 \mu\text{g/kg}$.

<i>Matrice</i>	Concentration moyenne \pm écart-type ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
<i>Muscle (cuisse et longe)</i>	12,53 \pm 2,2	100
<i>Foie</i>	14,32 \pm 3,3	300
<i>Rein</i>	33,8 \pm 6,7	600

Tableau 7. Résultats des dosages tissulaires

Conclusion

Les résultats de cette étude ont montré que, à la différence de la SDMT, l'exposition des animaux à une alimentation contaminée avec l'OTC à des concentrations tolérées par les bonnes pratiques de fabrication n'entraînait pas de résidus dans les denrées alimentaires à des concentrations supérieures aux LMRs fixées pour les tissus. Néanmoins, l'OTC se retrouvait principalement au niveau des fèces, ce qui est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature sur la faible absorption orale et biodisponibilité de cette molécule [70, 147]. La présence de résidus d'antibiotique dans les fèces animales pourrait représenter un risque pour l'éleveur mais également pour l'environnement car ces concentrations pourraient contribuer à la sélection d'antibiorésistance.

Les deux études réalisées sur trois molécules différentes montrent qu'il est important de prendre en compte les propriétés pharmacocinétiques des molécules pour la fixation des limites de contamination croisée, non seulement pour considérer les concentrations intestinales qui pourraient sélectionner la résistance, mais également pour ne pas dépasser les LMR établies.

III- Etude du risque de sélection d'antibiorésistance

Le troisième objectif de la thèse était d'évaluer le risque de sélection de bactéries résistantes dans le microbiote intestinal des animaux par des antibiotiques présents à des concentrations sub-thérapeutiques dans un aliment contaminé. Pour cette étude, l'oxytétracycline a été l'antibiotique de choix de par sa faible absorption et biodisponibilité orale impliquant l'exposition des bactéries intestinales à de fortes concentrations.

Pour cela, 16 porcs ont été divisés en deux groupes, un groupe contrôle et un groupe traité à l'oxytétracycline à 1% de la dose posologique dans l'aliment. Des fèces ont été prélevées avant et pendant l'étude et des dénombrements sur milieu avec et sans antibiotiques ont été faits afin de suivre l'évolution des populations fécales des *E. coli* totaux et des *E. coli* résistants. De même, des colonies des boîtes sans antibiotique ont été récupérées et purifiées pour réaliser des tests de sensibilité aux antibiotiques et étudier les co-résistances à l'oxytétracycline. La caractérisation du groupe phylogénétique a été également effectué sur ces isolats. Un résumé de l'étude est présenté dans la figure 44.

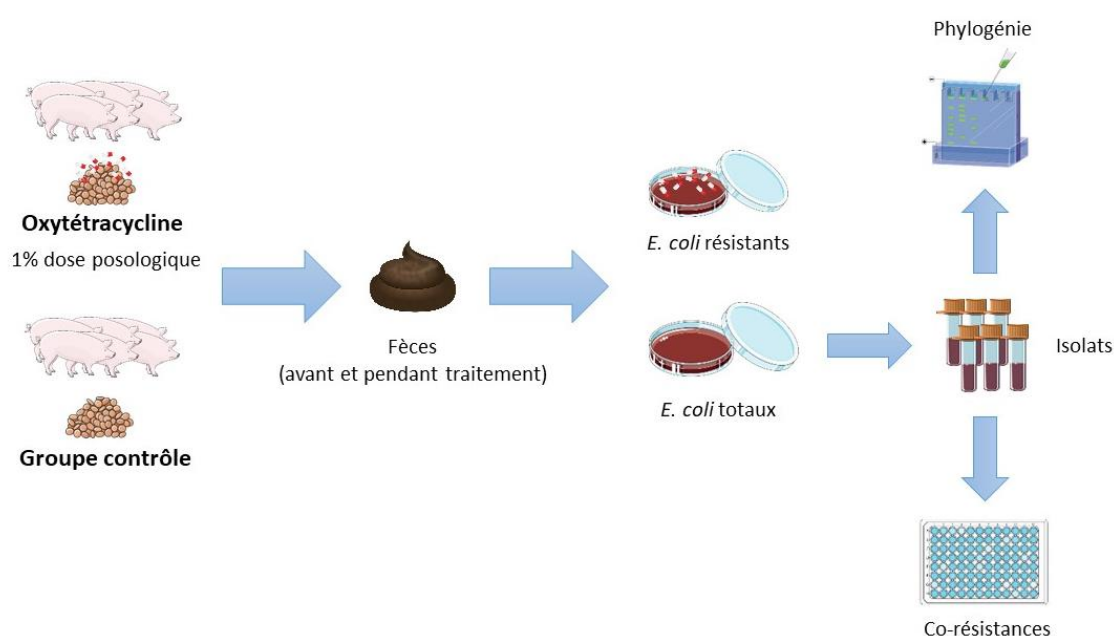


Figure 44. Résumé de l'étude animale réalisée sur l'étude de la sélection de résistance*

Les résultats de cette étude ont fait objet d'un article scientifique publié dans le journal « Veterinary Microbiology ».

Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Gaugain, M., Viel, A., Paboeuf, F., Taillandier, J-F., Houée, P., Valentin, C. & Perrin-Guyomard, A.(2023) : Selection of antibiotic resistance in pigs after exposure to feed cross-contaminated with oxytetracycline. Veterinary Microbiology..



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Selection of antibiotic resistance in pigs after exposure to feed cross-contaminated with oxytetracycline

Cristina Santos-Santórum Suárez^a, Pascal Sanders^a, Murielle Gaugain^a, Alexis Viel^a, Frédéric Paboeuf^b, Jean-François Taillandier^a, Pamela Houée^a, Charlotte Valentin^a, Agnès Perrin-Guyomard^{a,*}

^a ANSES-Fougères Laboratory (French National Agency for Food, Environment and Occupational Health & Safety), 10 B, rue Claude Bourgelat – Javené, CS 40608, 35306 CEDEX Fougères, France

^b ANSES-Ploufragan-Plouzané Laboratory (French National Agency for Food, Environment and Occupational Health & Safety), 22440 Ploufragan, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Antibiotic
Antimicrobial resistance
Cross-contamination
Oxytetracycline

ABSTRACT

Due to possible cross-contamination of animal feedstuff with antibiotics, food-producing animals may be exposed to undesirable low concentrations of antimicrobials. These sub-therapeutic levels of antibiotics can lead to the selection of resistant bacteria in the animal gut. The goal of this study was to assess, through analysis of the faeces of treated and control pigs, the risk of resistant *E. coli* being selected after daily exposure for three weeks to feed contaminated with oxytetracycline at 1% of the therapeutic dose. Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry was used to determine the oxytetracycline concentrations in faecal samples. In the treated group, concentrations were in the range of 4481.9 – 8671.2 µg/kg. In the control group, these concentrations were either below the method's limit of quantification or up to 60.5 µg/kg. After a transient increase in resistance in both groups, microbiological analysis showed that the treated group had a significantly higher oxytetracycline resistance rate by the end of the study than the control group ($p < 0.001$). Furthermore, the treated animals were found to select co-resistances to nalidixic acid and ampicillin. Finally, at tolerated antibiotic contamination levels of feed, the treated group had a higher proportion of multidrug-resistant isolates at the end of the study than the control one ($p < 0.05$). The present study demonstrates that, at the tolerated contamination rates, both antimicrobial resistance and multidrug-resistant bacteria can be selected and evidenced in the gut microbiota.

1. Introduction

Antimicrobial resistance is currently a major issue that concerns both animal and human health. Even though the use of antibiotics as growth promoters in food-producing animals has been banned in the European Union since 2006 (European Commission, 2003), and despite the publication of guidelines for their proper use in veterinary medicine (World Health Organization, 2017), the potential presence of antimicrobials in animal feedstuff due to cross-contamination is a real concern. Indeed, because production lines are used both for medicated and non-medicated animal feedstuff, there may be a carry-over, leading to the unintended presence of trace antimicrobials in feed. This contamination, which appears unavoidable, can occur not only during feed fabrication, but also during transportation or storage either at the feed

mill or on the farm (Borràs et al. 2011; Stolker et al. 2013; Filippitzi et al. 2016). This problem has already been reported in several studies that have demonstrated the undesirable presence of low concentrations of antibiotics in animal feedstuff (Lynas et al. 1998; Robert et al. 2016; Gaugain et al. 2020; Przeniosło-Siwczyńska et al. 2020).

In France, cross-contamination of feed with antibiotics is regulated by the Good Manufacturing Practices published by the Ministry of Agriculture and Fisheries. This document establishes a maximum contamination rate of 5% for the first batch following production of medicated feed, and 1% for the next one (French Ministry of Agriculture and Fisheries, 2007).

Between 2017 and 2018, monitoring plans were carried out in France during which 100 pig, poultry and rabbit feed samples were collected each year from different farms and analysed for 11

* Corresponding author.

E-mail address: agnes.perrin-guyomard@anses.fr (A. Perrin-Guyomard).

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109924>

Received 29 June 2023; Received in revised form 18 October 2023; Accepted 20 November 2023

Available online 22 November 2023

0378-1135/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

antimicrobials. The most frequently found antibiotics were oxytetracycline, sulfadiazine and sulphadimethoxine (Gaugain et al. 2020).

The exposure of animals to contaminated feed may lead to the presence of antimicrobial residues in food of animal origin, even possibly to levels above the maximum residue levels (MRLs) for some antibiotics. Furthermore, the consumption of low antibiotic concentrations by animals can play an important role in the selection of resistant bacteria in the gut microbiota.

It is well known that therapeutic concentrations of antibiotics can select for resistant bacteria. However, literature on how sub-therapeutic levels of antimicrobials can also select for resistant mutants is still scarce (EFSA. 2021).

Some studies have demonstrated in vitro that levels of antibiotics under the minimum inhibitory concentration (MIC) can select *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* or *Pseudomonas aeruginosa* (Gullberg et al. 2011; Jørgensen et al. 2013; Gullberg et al. 2014; Peeters et al. 2018; Moore et al. 2021), or can lead in vivo to specific selection in the gastrointestinal bacterial populations of pigs (Holman and Chénier 2013; Lin et al. 2017).

Recently, the European Food Safety Authority (EFSA) developed different approaches to predict the antimicrobial levels in non-medicated feed that would not result in the emergence and/or selection of resistance. However, these approaches are based on the very limited data available on the specific link between a low concentration of antimicrobial in feed and the selection and development of resistance to antibiotics relevant for human and animal health in the gut microbiota of animals (EFSA. 2021). Therefore, the goal of this study was to produce new in vivo data in order to evaluate the risk of selection of antimicrobial resistance in pig intestinal microbiota after exposure to feed contaminated with low concentrations of oxytetracycline.

2. Materials and methods

2.1. Animal study design and sample collection

An animal study, approved by the French Committee on Animal Research and Ethics, was carried out with 12 pigs. Specific-pathogen-free (SPF) pigs were provided by ANSES's Ploufragan laboratory (France). The pigs were randomly divided into two groups of six animals each: a control group and a treated one. To avoid any design bias, both groups were housed in the same room, and all the animals belonging to the same group were kept together in the same box. For 18 days, the treated group received feed contaminated with an oxytetracycline (OTC) premix (OTC 40-CR from Huvepharma, Segré-en-Anjou Bleu, France) at a concentration corresponding to 1% of the recommended therapeutic dose (i.e. 0.25 g premix/kg feed/day). This dose is tolerated by the Good Manufacturing Practices for animal feed production (French Ministry of Agriculture and Fisheries. 2007). Hence, the administered dose was 10 mg of OTC/kg of feed per day (i.e. 0.5 mg/kg body weight/day). Feed intake was monitored and corresponded to 50 g per kg of body weight per day and the daily dose was divided into two administrations. Finally, in order to adjust the administered dose of premix and the amount of feed required, the animals were weighed every week and the mean of these values was used to adapt the quantities accordingly.

Faeces from each animal were sampled after spontaneous defecation four days before the treatment (T0), and four times during the 3-week OTC treatment (on days 3, 7, 10 and 17 after the first day of OTC administration, i.e. T1, T2, T3 and T4). The fresh faecal samples were processed as follows: 5 ± 0.5 g was weighed and diluted to 1:10 by adding 45 ml of 0.9% saline solution (Labocea, Fougères, France) containing 10% of glycerol (Dutscher, Bernolsheim, France). These samples were homogenised with a Stomacher® and the filtered suspensions were stored at -80 °C before microbiological analysis. The remaining faecal samples were stored at -80 °C before the extraction and OTC assay.

2.2. Microbiological analysis

2.2.1. Enumeration of total and resistant *E. coli* populations and assessment of the resistance rate

The fresh faecal samples were serially diluted in saline solution to obtain 10⁻² and 10⁻⁴ dilutions. Fifty µl of both dilutions in addition to the original (undiluted) samples was inoculated in duplicate with the Eddy Jet spiral automatic plater (IUL S.A., Barcelona, Spain) onto MacConkey agar (Labocea, Fougères, France) plates that contained either no antibiotic or OTC at 8 µg/ml. This OTC concentration corresponds to the epidemiological cut-off value (ECOFF) established by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) that allows a distinction to be made between a wild-type (WT) and non-wild type (NWT) ('microbiological' resistant) microorganism (<http://www.eucast.org>, last accessed 09/11/2022). Samples were then incubated at 44 °C for 18–24 h. After incubation, presumptive *E. coli* colonies were counted with the SphereFlash® automatic colony counter (IUL S. A., Barcelona, Spain) to estimate the total population and the NWT population. The OTC resistance rate, being the NWT/Total ratio between the mean of NWT *E. coli* colonies from plates containing OTC and the mean of total *E. coli* colonies from plates with no antibiotic was calculated for each pig. The mean of all NWT/Total ratios was then calculated in order to assess the OTC resistance rate in each group at each time point.

2.2.2. MIC determination and antimicrobial susceptibility testing

Six colonies of presumptive *E. coli* were randomly selected and sub-cultured from each antibiotic-free MacConkey agar plate on Brilliance™ agar plates (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) for purification. Isolates were stored at -80 °C until further analysis. The minimum inhibitory concentration of amikacin (AMK), ampicillin (AMP), azithromycin (AZM), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), chloramphenicol (CHL), ciprofloxacin (CIP), colistin (COL), gentamicin (GEN), meropenem (MEM), nalidixic acid (NAL), sulfamethoxazole (SMX), tetracycline (TET), tigecycline (TIG) and trimethoprim (TMP) was assessed for each isolate by broth micro-dilution, using EUVSEC3 Sensititre™ EU Surveillance Plates (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Antimicrobial susceptibility was assessed using the ECOFF value and the colonies were classified as WT/NWT. Multidrug-resistant (MDR) isolates, i.e. isolates resistant to at least three of the antimicrobial classes described above, were enumerated. Resistance to both CTX and CAZ and to both CIP and NAL are, respectively, addressed together.

2.2.3. Determination of the phylogenetic groups

A heat shock method was used to extract DNA from the six isolates from each animal at each sampling time. The phylogenetic group was then assigned by PCR according to Clermont et al. (2013) (Fig. 1).

2.3. Faecal extraction and LC-MS/MS analysis

In order to quantify the concentrations of OTC in faecal samples, a solid phase extraction (SPE) followed by LC-MS/MS analysis was performed as previously described (Santos-Santórum Suárez et al. 2022). The method's lower limit of quantification (LLOQ) was 20 µg/kg.

2.4. Statistical tests

A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether the treatment and the time had a significant impact on the OTC resistance rate among the *E. coli* population. The interaction between treatment and time was also assessed. Logistic regression models were then developed based on the antimicrobial susceptibility of the isolates (MICs) and their classification into WT or NWT. The goal of these models was to evaluate the potential effect of treatment and time on the selection of co-resistances, as well as to analyse MDR profiles. Like for the

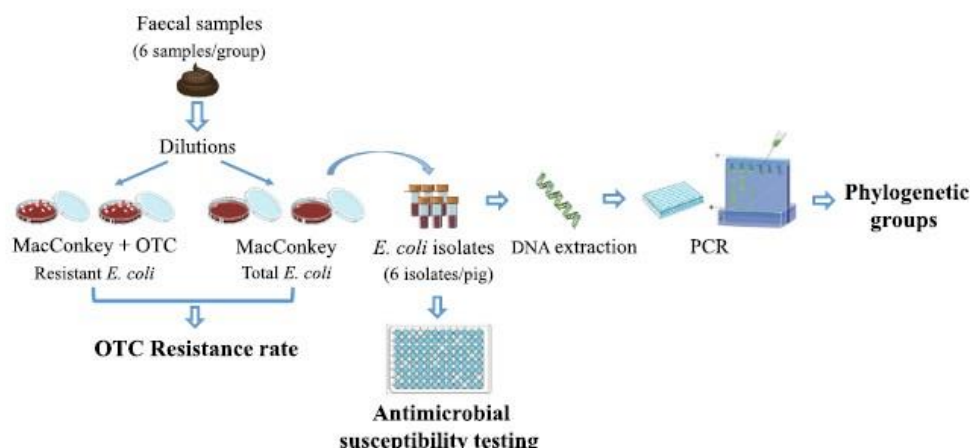


Fig. 1. Schematic representation of the complete microbiological analysis. This figure was partly generated using Servier Medical Art, provided by Servier, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 unported licence.

ANOVA, the interaction was tested. Fisher's exact test was also performed in order to compare the proportion of resistant isolates between both groups at T0 and T4.

A repeated measures ANOVA (RM-ANOVA) was performed so as to compare OTC concentrations in faeces between the treated animals and over time.

All the tests were performed with GraphPad Prism software (version 9.4.0) and R software (version 4.1.2). A p-value of 0.05 was taken as the limit of significance.

3. Results

3.1. Microbiological analysis

3.1.1. Total *E. coli* faecal population

Before the beginning of the treatment (T0), the mean total *E. coli* faecal population was of 6.7 log₁₀ CFU/g in the treated group and 7.02 log₁₀ CFU/g in the control one. They were not significantly different ($p > 0.05$). Nine days after arrival (between T0 and T1), all the pigs, but especially those belonging to the control group, had diarrhoea symptoms for four days. The presence of *Rotavirus* was verified but the test was negative for all the animals. At T1, the *E. coli* population in the control group significantly increased to 8.93 log₁₀ CFU/g ($p < 0.05$ when compared with T0), while it remained stable in the treated group (7.56 log₁₀ CFU/g, $p > 0.05$ when compared with T0), leading to significantly different concentrations between control and treated animals ($p < 0.05$). From T2 onwards (after the diarrhoea episode), the faecal *E. coli* population returned to its initial level in the control animals and remained stable in both groups until the end of the experiment, with no significant differences between the two groups ($p > 0.05$).

3.1.2. Oxytetracycline resistance rate in the *E. coli* faecal population

Before the beginning of the treatment, both treated and control groups had a low OTC resistance rate in the faecal *E. coli* population (a mean ratio of 0.078 ± 0.03 in the treated group, and of 0.248 ± 0.32 in the control group, see Fig. 3) but with great variability between pigs. As for the total *E. coli* population, this resistance rate briefly increased in the control group, reaching 0.818 at T1 without significance when compared with T0 ($p > 0.05$). A huge drop was then observed between T1 and T2 to reach a low resistance rate (0.078) which then stayed generally stable until the end of the experimental study. On the other hand, in the treated group, resistance rates constantly increased over the whole period, reaching a significant difference at T4 compared with T0 ($p < 0.01$). At the end of the study, the difference in the OTC resistance rate in the two groups was also highly significant ($p < 0.001$), the rate being 0.893 in the treated group and 0.093 in the control group. The

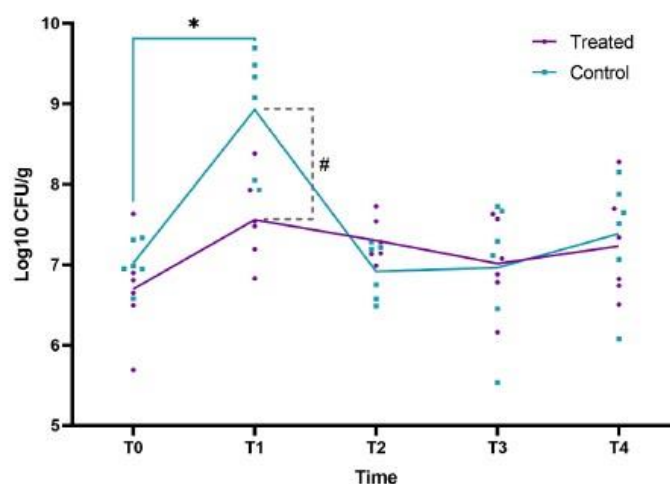


Fig. 2. Total faecal *E. coli* population count. T0 = day 4 before the beginning of the treatment; T1 = day 3 of treatment; T2 = day 7 of treatment; T3 = day 10 of treatment; T4 = day 17 of treatment. *: $p < 0.05$ between T0 and T1 in the control group. #: $p < 0.05$ between the treated and the control group at T1.

interaction between time and treatment was also significant ($p < 0.001$).

3.1.3. Antimicrobial susceptibility testing and co-resistance assessment

A total of 360 colonies were assessed for MIC testing (36 in each group at each time point). As shown in Fig. 4, a maximum of 11% of the colonies had an MIC to TET above the ECOFF in the control group taking the whole study into account, except for the transient event at T1, where 100% of the colonies were resistant to tetracycline. In the treated group, the number of *E. coli* isolates with an MIC to TET above the ECOFF value (8 mg/L) increased to reach 83% of resistance at T4 (with the vast majority of isolates having a high MIC $> 32 \mu\text{g/ml}$), highlighting the treatment's significant impact in selecting resistance to TET taking the whole study period into account ($p < 0.001$). The interaction between the group status and time was also significant ($p < 0.001$).

In the case of NAL, although OTC treatment seemed to play a role in the selection of NAL resistance taking the whole study into account, no significant difference was observed at T4 between both groups ($p > 0.05$). In the control group, some of the isolated strains are less susceptible but not resistant at T1.

In the control group, the number of *E. coli* resistant to AMP and TMP increased at T1 and decreased sharply at T2 and then regularly. The two distributions are not significantly different ($p > 0.05$) over the time

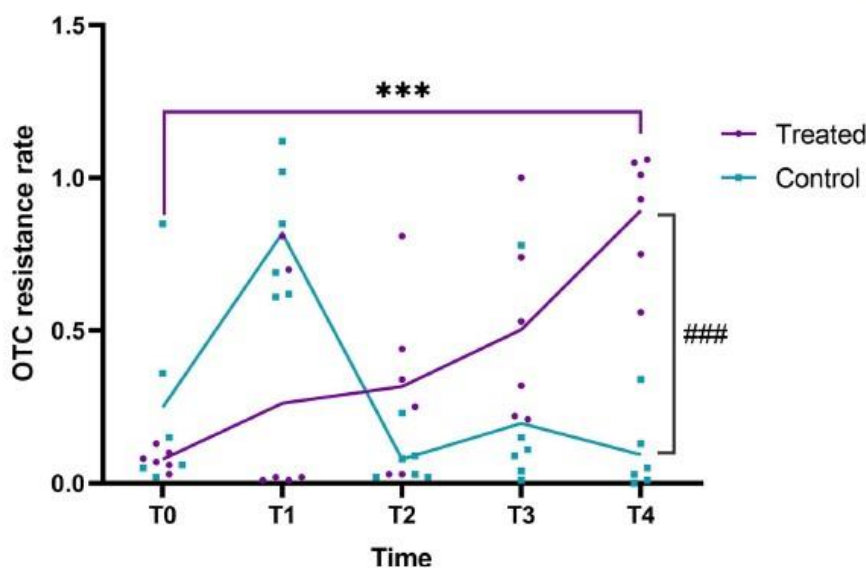


Fig. 3. Evolution of the average antimicrobial resistance rate to OTC in the *E. coli* faecal population over time in the treated and control groups. T0 = day 4 before the beginning of the treatment; T1 = day 3 of treatment; T2 = day 7 of treatment; T3 = day 10 of treatment; T4 = day 17 of treatment. * * * : $p < 0.001$ between T0 and T1 in the treated group. ###: $p < 0.001$ between the treated and the control group at T4.

exposure ($p > 0.05$). Nevertheless, a significant difference between both groups was observed at T4 for AMP ($p < 0.05$) while for TMP, this difference was very close to the limit of significance ($p = 0.055$). These differences were not present at the beginning of the study ($p > 0.05$).

Conversely, the number of *E. coli* isolates resistant to chloramphenicol was significantly higher ($p < 0.001$) in the control group than in the treated group when considering the whole study period. However, there was no significant difference at the end of the study between the two groups ($p > 0.05$).

No significant differences between the control and treated groups were observed for CIP and SMX taking the whole period of study into account ($p > 0.05$, data not shown).

Only one strain isolated from a treated animal was resistant to CTX (at T1) and only one from a control animal had an MIC to GEN above the ECOFF (at T4). No isolated *E. coli* resistant to AMK, AZM, CAZ, COL, MEM and TIG were observed during the treatment period in either of the two groups (data not shown).

All MDR results are shown in Fig. 5.

In the control group, only three of the isolated colonies were MDR before the beginning of the study (T0), all of them having a resistance profile corresponding to three antimicrobial families. On day 3, when the animals had diarrhoea, all the colonies were resistant to six different antibiotics with the same MDR profile, i.e. AMP-CHL-(fluoro)quinolone-SMX-TET-TMP resistances. On day 7, the number of MDR isolates decreased to seven and continued to decrease to five on day 10 and two at the end of the study. Between day 7 and day 17, all MDR isolates were resistant to three antimicrobial families.

In the treated group, five of the *E. coli* isolates were MDR, before administration of OTC (T0), of which three were resistant to three antimicrobials and two were resistant to four families of antibiotics. On day 3 after the beginning of OTC administration (T1), the number of MDR colonies increased to 14, and more than half of them (11 isolates) were resistant to more than three different antimicrobials, the majority of which (8 of the 36 isolated *E. coli* colonies) had a resistance profile to six antibiotics. The number of MDR strains isolated on day 7 (T2) increased slightly (15), but isolated strains were mostly resistant to only three antibiotics. On day 10 (T3), the number of MDR *E. coli* continued to increase (20), with 14 strains resistant to three antibiotics, five resistant to four antibiotics and one resistant to five antibiotics. Finally, at the end of the study (day 17, T4), six of the colonies were resistant to three antimicrobial families and five were resistant to four classes of

antibiotics. The most frequently observed MDR profiles were AMP-(fluoro)quinolone-TET at T0, AMP-CHL-(fluoro)quinolone-SMX-TET-TMP at T1, AMP-(fluoro)quinolone-TET at T2 and T3 and AMP-SMX-TET-TMP at T4.

OTC administration had no significant impact in the selection of MDR profiles ($p > 0.05$) taking the whole study period into account. However, there was a significant difference in the proportion of MDR *E. coli* between both groups by the end of the study ($p < 0.05$, T4), in contrast to the beginning (T0) ($p > 0.05$).

3.1.4. Phylogenetic group determination

All the phylotyping results are shown in Fig. 6. At the beginning of the study (T0), *E. coli* isolates belonging to phylogroups A and B1 were dominant in the control group (19 and 11, respectively) and in the treated group (18 and 14, respectively). Phylogroups B2 and E were also identified in lower proportions among *E. coli* isolated from pigs in the control group (5 and 1, respectively) as were phylogroups B2, C and D from pigs in the treated group (1, 2 and 1, respectively).

In the control animals, all the isolates belonged to group A at T1. This number then decreased between T2 and T4 to reach 18 colonies, the rest of the isolates belonging to phylogroup E (eight) phylogroup B1 (five) and phylogroup B2 (four). One isolate (out of 360) could not be assigned to any of the existing phylogroups.

In the treated animal group, the amount of phylogroup A isolates decreased from 17 to eight from T1 to T3, while phylogroup B1 isolates increased from 15 to 22. At the end of the study, phylogroup A returned to a level similar to that at the start of the experiment (20 isolates) in the treated group, followed by phylogroup B1 (eight isolates) and phylogroup C (eight isolates).

As shown in Fig. 7, all the MDR isolates belonged to phylogroups A, B1 or C. In isolates belonging to phylogroup A, the most common MDR profile was AMP-CHL-(fluoro)quinolone-SMX-TET-TMP resistances for both control and treated groups. For phylogroup B1, the most abundant MDR profile was AMP-(fluoro)quinolone-TET for the treated animals, while for the control ones the dominant profiles were AMP-CHL-TET and AMP-SMX-TMP, even though AMP-(fluoro)quinolone-TET resistances were also present. Finally, for phylogroup C the only observed MDR profile was AMP-SMX-TET-TMP, identified exclusively in the treated group.

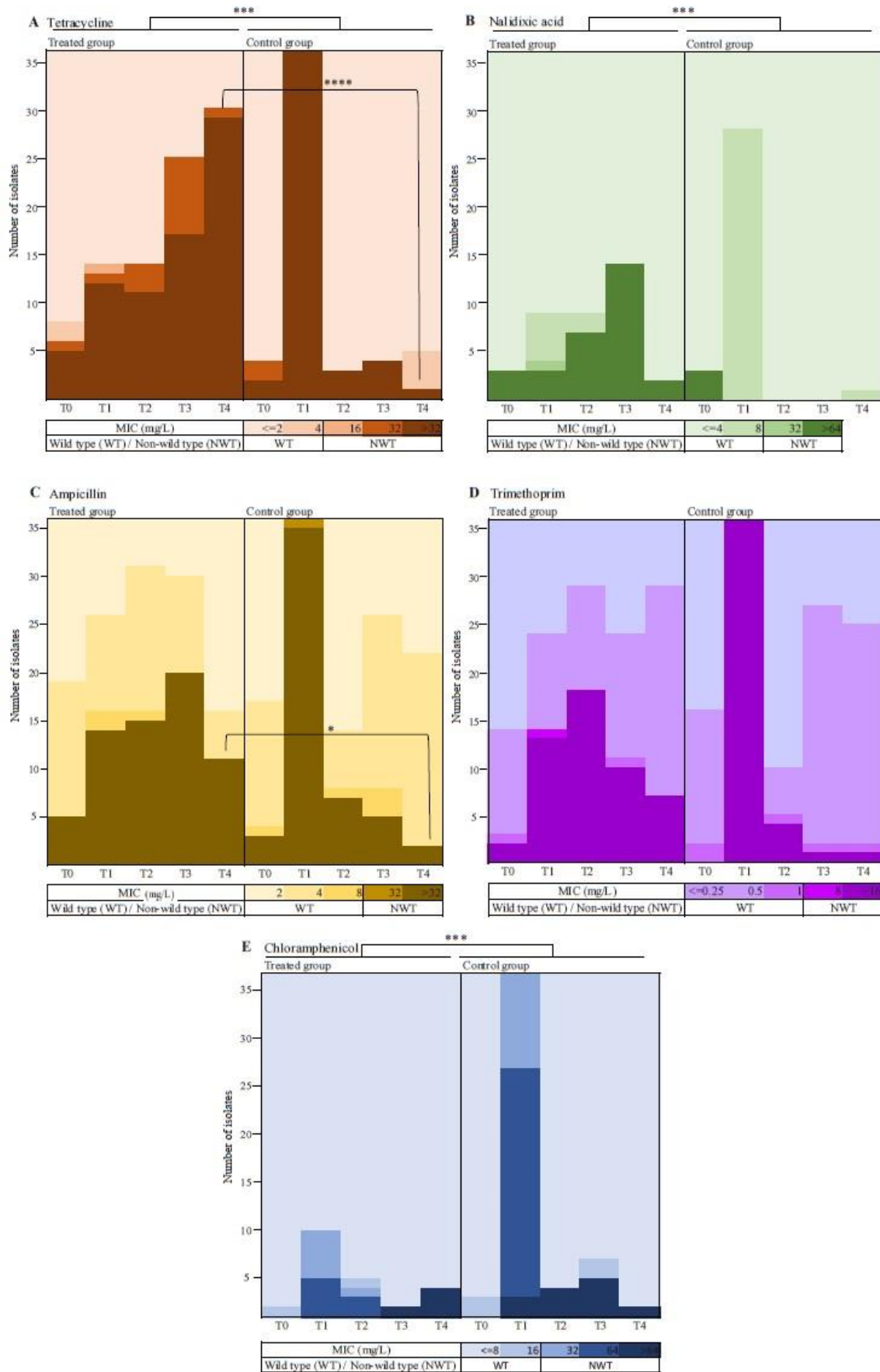


Fig. 4. Distribution of the minimum inhibitory concentrations (MICs) of tetracycline (A), nalidixic acid (B), ampicillin (C), trimethoprim (D) and chloramphenicol (E) in the treated and control groups over time. * = $p < 0.05$ *** = $p < 0.001$ **** = $p < 0.0001$.

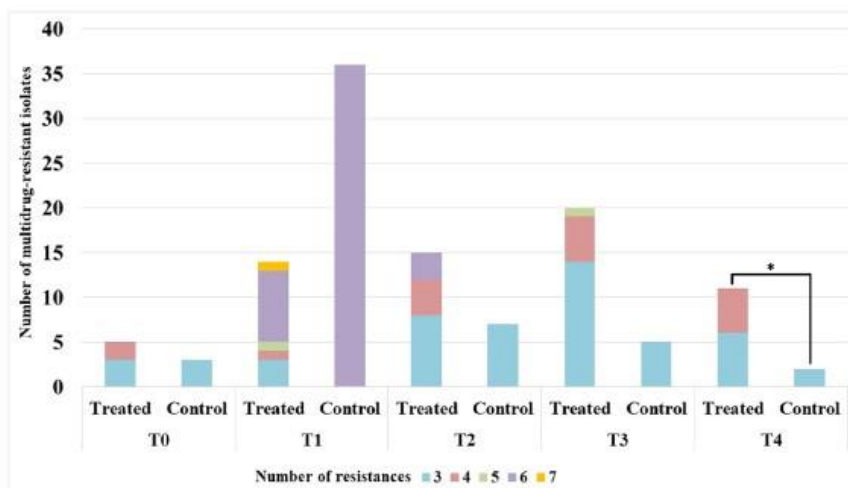


Fig. 5. Multidrug resistance profile of the *E. coli* isolates. * = $p < 0.05$.

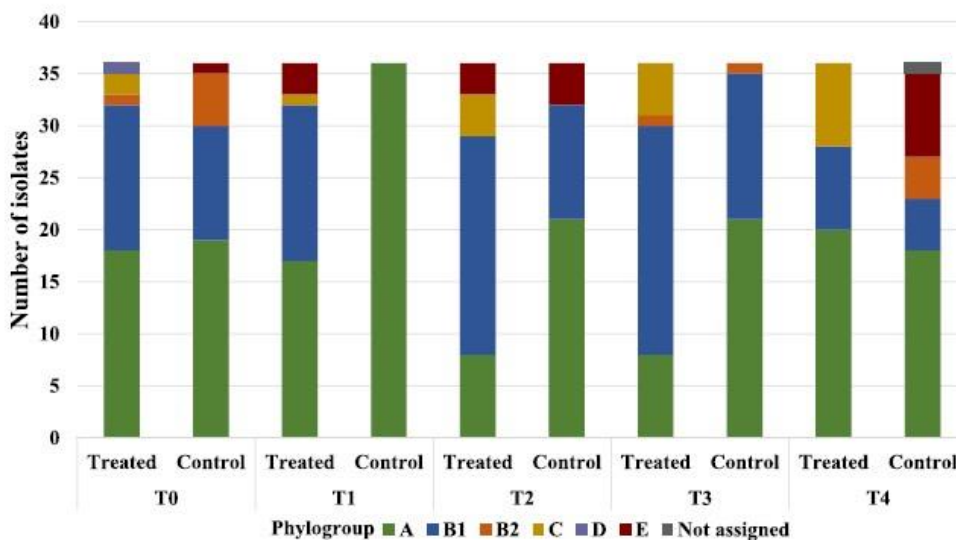


Fig. 6. Distribution of *E. coli* isolates in the phylogroups.

3.2. Oxytetracycline extraction and quantification by LC-MS/MS

The concentrations of OTC in the faeces of animals at each sampling timepoint are shown in Table 1. Before the beginning of the treatment (T0), trace amounts of OTC were observed in the faecal samples of the treated group. Then, at T1 the faecal concentration of OTC increased and remained between 4481.9 and 8671.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ until the end of the study. No significant difference was observed between the animals belonging to the treated group over time ($p > 0.05$). In the control group, the concentrations of OTC were below the LLOQ (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) before the beginning of the treatment (T0). Between T1 and T3, trace amounts of OTC were detected in the faecal samples from some of the control animals (less than 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$), which then decreased and remained below the LLOQ again at T4.

4. Discussion

Cross-contamination by antibiotics could occur between medicated animal feedstuff to non-target feed. Maximum levels of cross-contamination are regulated by the Good Manufacturing Practices. The goal of this study was to evaluate the impact of these levels in the selection of antibiotic resistance in pigs exposed to a contaminated feed.

The microbiological analysis performed on the faecal samples showed that, taking the whole study into account, there was no difference in the size of the total *E. coli* population between both treated and control groups over time, except for a transient episode of diarrhoea experienced by the animals in the control group and some of the treated ones. The illness, which could have been caused by the change in the animals' environment or by their postweaning status (age), led to a perturbation in their microbiota, increasing both total and resistant *E. coli* populations in the control group. This kind of dysbiosis with an increase in *Enterobacteriaceae* associated with postweaning diarrhoea has already been reported previously (Dou et al. 2017). Furthermore, diarrhoea symptoms induced by pathogenic *E. coli* have already been reported in weaned pigs (Fairbrother et al. 2005; Tran et al. 2018). As this event affected both groups and all the animals were housed in the same room and thus living in the same conditions, a statistical comparison of the results is possible.

The uninterrupted exposure of pigs to feed contaminated with OTC, hence to low antimicrobial concentrations in feed, resulted in a highly significant increase in the resistance rate to OTC (and thus to TET) of *E. coli* in the gut microbiota of treated animals. To our knowledge, no in vivo studies have previously demonstrated the selection of resistant *E. coli* after exposure to a tetracycline at subtherapeutic levels. Our

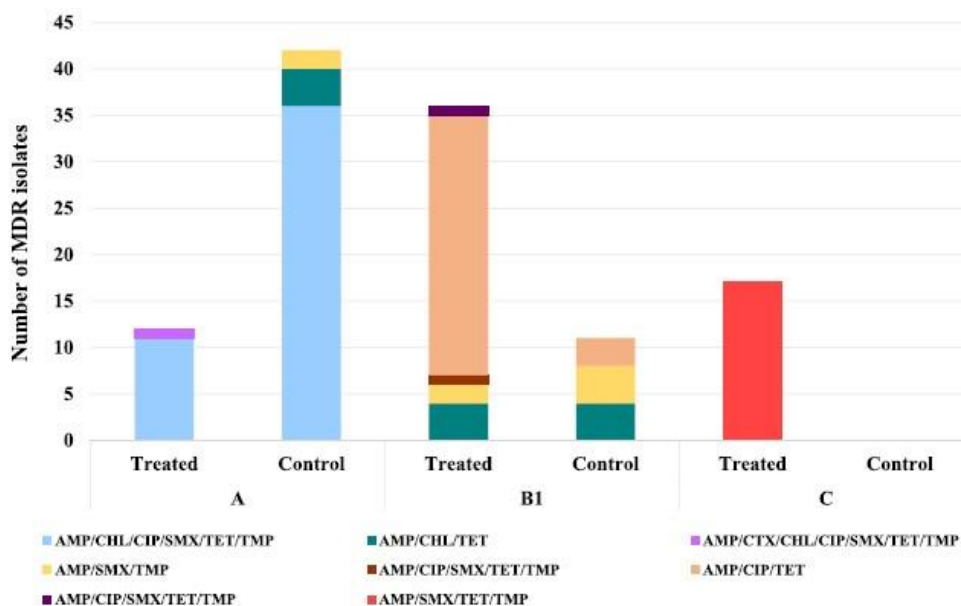


Fig. 7. Correlation between phylogenetic groups and the profile of multidrug-resistant isolates.

Table 1

Mean concentration and standard deviation of oxytetracycline in faeces (in $\mu\text{g}/\text{kg}$) in the treated and control groups. LLOQ=lower limit of quantification.

Day	Treated group Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm standard deviation	Control group Mean ($\mu\text{g}/\text{kg}$) \pm standard deviation
T0	27.78 \pm 11.25 ^a	<LLOQ
T1	6491.95 \pm 1430.6	24.12 \pm 9.97 ^a
T2	7257.74 \pm 1524.3	46.19 \pm 12.11
T3	6673.83 \pm 317.6	23.36 \pm 6.64 ^a
T4	6064.80 \pm 1381.5	<LLOQ

^a Uncertainty of the results unknown because some of the samples are below the LLOQ

results agree with what Holman and Chénier (Holman and Chénier 2013) reported in their study: after exposure of pigs to subtherapeutic levels of tylosin, a significant increase in tylosin-resistant anaerobes was observed compared with the control group. Similarly, Lin et al. (Lin et al. 2017) conducted an in vivo study in which they compared the effect of two antimicrobials (ceftiofur and enrofloxacin) at therapeutic and sub-therapeutic levels on *E. coli* gastrointestinal sub-populations in pigs. They observed that the groups treated with sub-therapeutic concentrations of antibiotics showed significantly higher rates of resistant *E. coli* than the therapeutic or control groups.

The LC-MS/MS analysis of faecal samples revealed relatively high concentrations (around 6000–7000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) of OTC in the treated group compared with the control group. This agrees with what is described in the literature about OTC having low oral bioavailability and absorption (Mevis et al., 1986; Nielsen and Gyrd-Hansen, 1996). Using an ECOFF of 8000 $\mu\text{g}/\text{L}$, we could imagine that the gut's bacterial population could be exposed to OTC concentrations below this epidemiological limit, especially if there is binding to the intestinal content, which occurs for tetracycline in humans (Ahn et al. 2018), and that this could increase the risk of selection of resistance. Moreover, in vitro competition approaches between isogenic susceptible and resistant bacteria have demonstrated that exposure to a range of antibiotic level between the Minimum Selective Concentration (MSC) and the MIC of the sensitive strain represents a sub-MIC selective window in which resistant bacteria have an advantage. Sensitive bacteria are still able to grow and thus a wider spectrum of resistant mutants can emerge. This means that sub-MIC doses of antibiotics can select for more stable mutants than high

doses, i.e. these mutations are less likely to be reversed after exposure to the antibiotic. These mutations are likely to have a low fitness cost and would therefore be more stable, even in the absence of the antibiotic (Gullberg et al. 2011; Andersson and Hughes, 2014; Sandegren, 2014). Furthermore, these antibiotic residues could spread through the environment, representing a risk for public health. In the control group, traces of OTC were detected between days 3 and 10, probably due to contamination in the boxes where the animals were located. However, these concentrations are negligible when compared with those found in the treated group (more than 150 times lower) and they did not lead to an increase in the resistance rate.

In our conditions, due to the presence of very low levels of residues in the control group, we could also conclude that a low concentration around 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in faeces does not lead to resistance selection.

Selection of resistance to the antimicrobial that was used is expected, but co-selection of resistance to other antibiotics can also occur when other AMR genes are located on the same genetic element than genes involved in OTC resistance. Interestingly, an increase in the resistance rate to antimicrobial drugs from other families, such as nalidixic acid and ampicillin, was also observed in the treated group, with a tendency also observed for trimethoprim. New studies should investigate this further. Similar results were observed by do V. Barroso et al. (do V. Barroso et al. 2022) in whose study co-resistance to doxycycline, cephalexin and kanamycin was selected after pigs' exposure to sub-therapeutic levels of a combination of colistin and tylosin in feed.

In the present study, selection of co-resistances to other antimicrobial families led to selection of MDR *E. coli* in the treated group after three weeks of exposure to low concentrations of OTC when comparing to the control group. The results show that the exposure of animals to sub-MIC concentrations of an antibiotic via contaminated feed may not only select *E. coli* resistant to the administered antibiotic, but also to other families of antimicrobials such as sulphamides, penicillins, (fluoro)quinolones and diamnopyrimidines. These resistant bacteria may then be disseminated to humans or into the environment.

Phylogenetic analysis showed that the most frequently identified groups were A and B1. Furthermore, all the resistant or MDR strains belonged to groups A, B1 or C, which suggests that these resistant *E. coli* isolates in the animal gut were commensal (Clermont et al. 2013). Moreover, in addition to having the same MDR profile, all the strains from the control group at T1 belonged to phylogroup A. This may mean that the diarrhoea symptoms led to dominance of a potential *E. coli* clone

in the gut microbiota or, on the contrary, this potential clone could have induced the disease (Denamur et al. 2021). Further sequencing studies should be performed to check whether these strains are clones or not.

5. Conclusion

The present study showed that the exposure of food-producing animals to feed cross-contaminated with OTC lead to the selection of OTC-resistant *E. coli* in the gut microbiota. Moreover, co-resistance may also be selected, leading to multidrug-resistance profiles. In addition, antibiotic residues can be disseminated in the environment through animal faeces. In conclusion, the results of this study showed that cross-contamination of animal feedstuff with antibiotics can aggravate the antimicrobial resistance problem, which is currently a major public health issue.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank Michel Laurentie, Jérôme Blot, Jérôme Henri and Antoine Huguet for their help and support.

References

- Ahn, Y., Jung, J.Y., Veach, B.T., Khare, S., Gokulan, K., Piñeiro, S.A., Cerniglia, C.E., 2018. In vitro test systems to determine tetracycline residue binding to human feces. *Regul. Toxicol. Pharm.* 99, 105–115.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (7), 465–478.
- Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Pérez-Vendrell, A.M., Brufau, J., Medina, M., Bosch, J., 2011. Analysis of antimicrobial agents in animal feed. *Trends Anal. Chem.* 30 (7), 1042–1064.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5 (1), 58–65.
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., Gordon, D., 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 19 (1), 37–54.
- do V. Barroso, M., da Silva, J.S., Moreira, S.M., Sabino, Y.N.V., Rocha, G.C., Moreira, M.A.S., Bazzolli, D.M.S., Mantovani, H.C., 2022. Selection of Multidrug-Resistant Enterobacteria in Weaned Pigs and Its Association With In-feed Subtherapeutic Combination of Colistin and Tylosin. *Curr. Microbiol.* 79 (11), 349.
- Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhal, L., Larcher, T., Bahi-Jaber, N., Pinon-Quintana, A., Guyonvarch, A., et al., 2017. Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. *PLoS One* 12 (1), e0169851.
- EFSA, 2021. Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 1: Methodol. Gen. data gaps uncertainties 1831-4732.
- European Commission. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, 2003.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, E., Gyles, C.L., 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6 (1), 17–39.
- Filippitzi, M.E., Sarrazin, S., Imberechts, H., Smet, A., Dewulf, J., 2016. Risk of cross-contamination due to the use of antimicrobial medicated feed throughout the trail of feed from the feed mill to the farm. *Food Addit. Contam. Part A* 33 (4), 644–655.
- French Ministry of Agriculture and Fisheries, 2007. Décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux. *J. Off. De. la République Fr.*
- Gaugain, M., Fommond, M.P., Fuselier, R., Verdon, E., Roudaut, B., Pessel, D., 2020. Control of Antimicrobials in Feed Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Assessment of Cross-Contamination Rates at the Farm Level. *J. Agric. Food Chem.* 68 (34), 9033–9042.
- Gullberg, E., Albrecht, L.M., Karlsson, C., Sandegren, L., Andersson, D.I., 2014. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio* 5 (5), e01918-01914.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* 7 (7), e1002158.
- Holman, D.B., Chénier, M.R., 2013. Impact of subtherapeutic administration of tylosin and chlortetracycline on antimicrobial resistance in farrow-to-finish swine. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85 (1), 1–13.
- Jørgensen, K.M., Wassermann, T., Jensen, P., Hengzuang, W., Molin, S., Højby, N., Ciofu, O., 2013. Sublethal ciprofloxacin treatment leads to rapid development of high-level ciprofloxacin resistance during long-term experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57 (9), 4215–4221.
- Lin, D., Chen, K., Xie, M., Ye, L., Chan, E.W.-C., Chen, S., 2017. Effect of ceftiofur and enrofloxacin on *E. coli* sub-population in pig gastrointestinal tract. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 10, 126–130.
- Lynas, L., Currie, D., McCaughey, W.J., McEvoy, J.D.G., Kennedy, D.G., 1998. Contamination of animal feedstuffs with undeclared antimicrobial additives. *Food Addit. Contam.* 15 (2), 162–170.
- Mevius, D.J., Vellenga, L., Breukink, H.J., Nouws, J.F., Vree, T.B., Driessens, F., 1986. Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in piglets following intravenous and oral administration. *Vet. Q* 8 (4), 274–284.
- Moore, J.E., Millar, B.C., Ollman-Selinger, M., Cambridge, L., 2021. The role of suboptimal concentrations of nebulized tobramycin in driving antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in cystic fibrosis. *Respir. Care* 66 (9), 1446–1457.
- Nielsen, P., Gyrd-Hansen, N., 1996. Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs. *J. Vet. Pharm. Ther.* 19, 305–311.
- Peeters, L.E.J., Croubels, S., Rasschaert, G., Imberechts, H., Daeseleire, E., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Butaye, P., Haesebrouck, F., Smet, A., 2018. Effect of residual doxycycline concentrations on resistance selection and transfer in porcine commensal *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51 (1), 123–127.
- Przeniosło-Siwczyńska, M., Patyra, E., Grelik, A., Chyłek-Purchala, M., Kozak, B., Kwiatek, K., 2020. Contamination of animal feed with undeclared tetracyclines—confirmatory analysis by liquid chromatography-mass spectrometry after microbiological plate test. *Mol. (Basel, Switz.)* 25 (9).
- Robert, C., Brasseur, P.-Y., Dubois, M., Delahaut, P., Gillard, N., 2016. Development and validation of rapid multiresidue and multi-class analysis for antibiotics and anthelmintics in feed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.: Part A* 33 (8), 1312–1323.
- Sandegren, L., 2014. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Ups. J. Med. Sci.* 119 (2), 103–107.
- Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., Hurtaud-Pessel, D., Laurentie, M., Viel, A., Taillandier, J.-F., Lagree, M.-P., Gaugain, M., 2022. Validation of a LC-MS/MS method for the quantitative analysis of four antibiotics in pig tissues and plasma to assess the risk of transfer of residues to edible matrices after exposure to cross-contaminated feed. *Food Addit. Contam.: Part A* 39 (11), 1818–1827.
- Stolker, A.A., Manti, V., Zuidema, T., van Egmond, H., Deckers, E.R., Herbes, R., Hooglugt, J., Olde Heuvel, E., de Jong, J., 2013. Carry-over of veterinary drugs from medicated to non-medicated feeds in commercial feed manufacturing plants. *Food Addit. Contam. Part A* 30 (6), 1100–1107.
- Tran, T.H.T., Everaert, N., Bindelle, J., 2018. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102 (1), 17–32.
- World Health Organization, 2017. WHO Guidelines on Use of Medically Important Antimicrobials in Food-Producing Animals. World Health Organization.

PARTIE III :
DISCUSSION,
PERSPECTIVES ET
CONCLUSION

I- Discussion et perspectives

La contamination croisée des aliments pour animaux par des médicaments vétérinaires, et plus particulièrement par des antibiotiques, est une problématique actuelle qui semble être inévitable. Ceci est dû principalement à l'utilisation de lignes de production communes pour les aliments médicamenteux et les non médicamenteux mais elle peut aussi avoir lieu pendant toutes les étapes dès la fabrication, jusqu'au transport et au stockage, que ce soit au niveau de l'usine de fabrication ou de la ferme. Plusieurs facteurs tels que, les propriétés des substances, la disposition des infrastructures ou les techniques de nettoyage, influencent ce phénomène et le rendent difficile à maîtriser.

Ce phénomène de contamination croisée peut engendrer la présence non intentionnée de traces d'antibiotiques dans les aliments pour animaux et, donc, exposer ces derniers à des faibles concentrations d'antibiotiques. Cette exposition des animaux peut entraîner plusieurs risques pour l'homme : d'un côté, la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale et d'un autre côté, la possible sélection d'antibiorésistance dans le microbiote des animaux.

Le premier objectif des travaux de thèse a été de développer et valider les méthodes analytiques par LC-MS/MS afin de quantifier les quatre antibiotiques de choix (amoxicilline, oxytétracycline, sulfadiméthoxine et triméthoprim) dans différentes matrices de porc (plasma, fèces, muscle, foie et rein). La validation a été réalisée selon l'approche du profil d'exactitude et toutes les méthodes ont pu être validées, excepté la méthode pour le dosage de l'amoxicilline dans les fèces. Pour cette dernière, des problèmes liés à la détection de l'amoxicilline dans cette matrice ont empêché la finalisation du développement. Le choix des quatre molécules a été fait selon deux critères : les antibiotiques les plus utilisés chez les porcs sous forme d'aliment médicamenteux ainsi que ceux qui ont été les plus retrouvés lors des plans de surveillance réalisés en France dans les aliments pour animaux. Les méthodes ont ensuite été appliquées lors d'une étude pilote qui a permis d'avoir une première approche de l'ordre de grandeur des concentrations tissulaires, fécales et plasmatiques des antibiotiques. L'objectif était de savoir si une réadaptation des gammes de concentration couvertes par les méthodes était nécessaire, mais également d'établir les conditions des expérimentations animales pour les études principales. Suite à cette étude, au vu des concentrations

d'amoxicilline, qui étaient en dessous de la LLOQ de la méthode, et des problèmes rencontrés avec l'extraction de cette molécule dans les fèces, nous avons décidé de poursuivre les études ultérieures sans cet antibiotique.

Perspective 1

Dans le futur des études approfondies afin de résoudre les problèmes d'extraction de l'amoxicilline dans les fèces pourraient être effectuées. S'il s'agit d'un problème de dégradation de la molécule, éventuellement, l'ajout d'un inhibiteur de bêta-lactamase pourrait être testé afin de voir si ceci est dû à un problème de clivage du cycle bêta-lactame provoqué par des bactéries fécales.

Le deuxième objectif était d'évaluer la présence de résidus dans les denrées d'origine animale après exposition d'un groupe de porcs à un aliment contaminé. Une première étude a été menée avec l'association sulfadiméthoxine/triméthoprime à 2% de la dose thérapeutique. Les résultats ont montré que, à des taux de contamination tolérés par les BPF françaises, la sulfadiméthoxine était retrouvée à des concentrations dépassant les LMR dans le muscle, le foie et le rein de porc, contrairement au triméthoprime, dont les concentrations restaient en dessous de la LLOQ pour le foie et le muscle, et en dessous de la LMR pour le rein. La présence de résidus d'antibiotiques aux concentrations mesurées dans les denrées alimentaires représente un risque faible pour le consommateur en termes d'effets toxiques, mais pourrait entraîner un risque économique et réglementaire pour l'éleveur, le vétérinaire et la firme d'aliment en cas de contrôle des denrées et d'absence de prescription associée pouvant entraîner une pénalisation. Dans le cas des sulfamides, le risque microbiologique lié à la présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées n'a pas été pris en compte lors de la fixation des LMR.

Des analyses ciblées et non ciblées par HRMS ont également été réalisées sur les échantillons de foie pour la recherche de métabolites de la sulfadiméthoxine. Deux métabolites potentiels de phase II ont été mis en évidence avec l'analyse ciblée : le métabolite acétylé et le glucuronidé. Il s'agit de métabolites putatifs identifiés sur la base des masses exactes et une vérification sera nécessaire. L'analyse non ciblée s'est révélée moins adaptée pour ce type d'étude du fait de la grande quantité d'ions significatifs retrouvés, ce qui rend l'analyse des

données plus difficile et chronophage. De plus, même si les porcs sont issus du même élevage, nos échantillons contrôles et traités ne provenant pas de la même étude (étude pilote et étude principale), la comparaison des profils métabolomiques des deux groupes pourrait être biaisée par certaines différences dans les conditions d'élevage des animaux. Ceci pourrait entraîner une augmentation du nombre d'ions candidats qui ne seraient pas en lien avec le traitement.

Perspective 2

De potentiels métabolites de la sulfadiméthoxine ont été mis en évidence. Cependant, ces résultats restent à confirmer. L'identification nécessiterait l'injection de standard de ces métabolites afin de confirmer qu'il s'agit bien de ces molécules [148, 149].

Lorsque ces standards n'existent pas, différents niveaux d'identification peuvent néanmoins être atteints [150]. Afin d'identifier les métabolites potentiels de la sulfadiméthoxine à partir de comparaisons de profils métabolomiques du foie, une nouvelle étude pourrait être réalisée à des concentrations posologiques sur deux groupes d'animaux : un groupe contrôle et un groupe traité, élevés dans les mêmes conditions. Des acquisitions en Full scan et MS/MS (DDA) pourraient apporter des éléments d'identification. Des temps de rétention prédits pourraient également apporter un niveau de confiance supplémentaire.

Au cours de ce travail, un modèle pharmacocinétique pour la sulfadiméthoxine a été développé et ajusté aux données plasmatiques, avec l'objectif de prédire les concentrations tissulaires en fonction du taux de contamination. Les simulations réalisées ont permis d'estimer que la contamination de l'aliment en sulfadiméthoxine devrait être au maximum de 0,2% de la dose thérapeutique, pour ne pas avoir de concentrations tissulaires dépassant les LMR. Ces simulations ont néanmoins certaines limites car elles sont basées sur l'hypothèse de la linéarité de la cinétique de la sulfadiméthoxine et une estimation du ratio de concentrations tissu/plasma obtenu sur un seul temps d'abattage.

Perspective 3

L'analyse pharmacocinétique présentant certaines limites, il pourrait être envisagé de réaliser une étude plus complète avec des cinétiques tissulaires sur plusieurs échéances pour élaborer un modèle plus élaboré tels qu'un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie.

De plus, une étude pourrait être faite avec la voie orale et la voie intraveineuse, ce qui permettrait d'obtenir des paramètres pharmacocinétiques tels que la biodisponibilité et améliorer la qualité du modèle.

Une étude similaire a été réalisée pour l'oxytétracycline, avec un groupe de 10 porcs qui ont reçu, pendant 11 jours, une alimentation contaminée à 2% de la dose posologique. Contrairement à la sulfadiméthoxine, les concentrations tissulaires restaient en dessous de la LMR, l'oxytétracycline se retrouvant principalement dans les fèces, ce qui montre les différences entre ces molécules en termes de biodisponibilité orale.

Perspective 4

D'autres études pourraient être faites avec d'autres sulfamides (comme la sulfadiazine, retrouvée lors des plans de surveillance français), car les résultats de la sulfadiméthoxine ne devraient pas être extrapolés à d'autres molécules de la même famille du fait des différences dans les propriétés pharmacocinétiques des molécules, et, donc, dans l'accumulation dans les tissus [151, 152].

Perspective 5

Considérant les plans de surveillance réalisés en France ainsi que les ventes d'antibiotiques sous formes de prémélanges, d'autres molécules ou même d'autres familles d'antibiotiques pourraient être étudiées, comme la chlortétracycline ou la tylosine (macrolide).

Enfin, le dernier objectif a été d'évaluer la possible sélection d'antibiorésistance dans le microbiote intestinal animal suite à une exposition à un aliment contaminé. Pour cela, un groupe contrôle a été comparé à un groupe recevant l'oxytétracycline à 1% de la dose posologique pendant 17 jours. Les analyses microbiologiques des échantillons fécaux ont montré une augmentation de la population *E. coli* résistante à l'oxytétracycline chez le groupe traité en comparaison au groupe contrôle à la fin de l'étude. Une sélection de co-résistances à d'autres antibiotiques et de profils multirésistants a également été observée.

Perspective 6

Du séquençage 16S a été fait pour étudier l'évolution des populations bactériennes dans le microbiote intestinal des animaux traités et contrôles au cours de l'étude. Ceci permettra d'approfondir les connaissances sur l'impact des antibiotiques à des faibles concentrations dans le microbiote intestinal. Des analyses par qPCR ont également été faites pour identifier les gènes de résistance présents dans les échantillons. Les traitements des données de ces deux analyses sont en cours et n'ont pas pu être présentés dans ce mémoire de thèse.

Perspective 7

Au début de l'étude, les animaux traités et témoins ont présenté un dysfonctionnement intestinal. Celui-ci a entraîné une augmentation de la population totale en *E. coli* et de la sous population résistante à l'oxytétracycline dans les deux groupes d'animaux. Les analyses réalisées chez le groupe témoin à cette échéance ont montré que les colonies prélevées présentaient toutes le même profil de résistance et appartenaient au même groupe phylogénétique. Dans le futur, une caractérisation pourrait être réalisée afin de confirmer s'il s'agit donc d'un clone ou pas. De plus, des analyses afin de chercher des facteurs de pathogénicité pourraient être menées pour savoir si ce sont des *E. coli* pathogènes qui sont à l'origine de la maladie.

Les résultats de ce travail montrent qu'une sélection de bactéries résistantes est possible avec l'oxytétracycline aux taux de contamination croisée actuellement tolérés dans les BPF. Ceci

pourrait contribuer au processus de sélection de bactéries résistantes en élevage avec une diffusion de bactéries et de gènes de résistance vers l'homme et l'environnement. Le développement de la résistance aux antibiotiques est un problème de santé globale nécessitant une approche « One Health ». Nos résultats avec l'oxytétracycline montrent que la population animale exposée est potentiellement plus grande que celle initialement estimée sur la base des seuls animaux traités.

Perspective 8

Une discussion de ces résultats avec les équipes en charge du suivi des indicateurs d'exposition aux antibiotiques en production animale permettrait de vérifier la pertinence de l'indicateur actuellement utilisé.

Une étude similaire pourrait être effectuée avec plus d'échéances de prélèvements post traitement. Ceci permettrait de voir si, une fois l'administration de l'aliment contaminé arrêtée, le pourcentage de résistance revient ou non aux valeurs initiales et, donc, de voir si la sélection de la résistance est réversible. De même, des études avec d'autres familles d'antibiotiques pourraient être envisagées pour mieux analyser la dynamique de la sélection au niveau intestinal.

II- Conclusion générale

Les travaux réalisés dans cette thèse ont permis d'approfondir les connaissances sur les risques associés à la contamination croisée des animaux par les antibiotiques en abordant d'un côté, le volet résidus et de l'autre, le volet antibiorésistance. Ces travaux sont complémentaires au récent rapport publié par l'EFSA sur le sujet et permettent de documenter les conséquences de l'exposition des animaux à des aliments contaminés par de faibles concentrations en antibiotique. Ils complètent également le rapport de la FAO sur la contamination croisée des aliments en apportant des résultats sur le risque de transfert vers les denrées d'origine animale.

Suite à une première étape de développement et validation d'une méthode analytique selon le profil d'exactitude, des expérimentations animales ont pu être réalisées et la présence de

résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, comme conséquence d'une alimentation contaminée, a été évaluée. D'un côté, une administration de la sulfadiméthoxine à des taux de contamination tolérés, entraînait un dépassement des LMR dans tous les tissus (muscle, foie et rein), contrairement au triméthoprim et à l'oxytétracycline, qui menaient à des concentrations soit en dessous de la LMR, soit en dessous de la LLOQ. Le développement d'un modèle pharmacocinétique a permis d'estimer le pourcentage de contamination qui permettrait de ne pas dépasser les limites en résidus autorisés. La valeur de contamination estimée (0,2%) est largement en dessous de ce qui est toléré actuellement dans la réglementation (5% pour le premier lot après un aliment médicamenteux et 1% pour le suivant).

De plus, l'exposition d'un groupe de porcs à une alimentation contaminée par l'oxytétracycline a mis en évidence une augmentation de la résistance à cet antibiotique dans la population de *E. coli*, en sélectionnant des souches avec des co-résistances associées, en comparaison à un groupe contrôle.

Sur la base de nos résultats, le risque de sélection d'antibiorésistance est double, d'un côté à travers la présence de résidus dans les denrées d'origine animale en cas de dépassement de la LMR, et d'un autre côté à travers l'exposition des animaux à un aliment contaminé.

La probabilité de chaque risque est dépendante des propriétés pharmacologiques des molécules.

Les résultats de ces travaux montrent le besoin de mettre en place des mesures pour éviter l'exposition non maîtrisée et involontaire des animaux producteurs de denrées à des faibles concentrations d'antibiotiques via l'alimentation. Ces actions pourraient commencer par diminuer les seuils de tolérance de contamination croisée et fixer des concentrations maximales, à la place des taux actuels qui sont un pourcentage de la dose posologique. Pour la fixation de ces limites il faudrait tenir compte, non seulement du risque d'antibiorésistance dans le microbiote intestinal des animaux, mais également de la pharmacocinétique des molécules et leur distribution dans les tissus, qui conditionne le dépassement ou non des LMR dans les denrées. De même, l'utilisation de deux lignes de production différentes pour les aliments médicamenteux et les non médicamenteux pourrait également aider à diminuer le

problème. Finalement, la réduction de ce type de forme pharmaceutique semble aussi une bonne option pour réduire la contamination croisée.

Cette thèse, de par sa transversalité, m'a permis d'approfondir mes connaissances dans différents domaines tels que la chimie analytique, la pharmacocinétique, la microbiologie, la métabolomique ou encore l'expérimentation animale. Les compétences acquises pendant ces trois ans m'aideront dans le futur pour travailler dans le domaine de la santé publique, de la sécurité sanitaire et du médicament, où j'aimerais poursuivre ma carrière.

Références

1. IFIP, *Le porc par les chiffres 2022-2023*. 2022.
2. Agreste. Available from: <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/> (consulté le 13/01/2023).
3. OCDE. *Consommation de viande (indicateur)*. 2020; Available from: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/data/aa2efdd2-fr> (consulté le 17/01/2023).
4. FAOSTAT. Available from: <https://www.fao.org/faostat/fr/> (consulté le 10/01/2023).
5. Eurostat. Available from: <https://ec.europa.eu/eurostat/fr/> (consulté le 11/01/2023).
6. Règlement (CE) No 767/2009 du Parlement européen et du Conseil du 13 juillet 2009 concernant la mise sur le marché et l'utilisation des aliments pour animaux, modifiant le règlement (CE) no 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 79/373/CEE du Conseil, la directive 80/511/CEE de la Commission, les directives 82/471/CEE, 83/228/CEE, 93/74/CEE, 93/113/CE et 96/25/CE du Conseil, ainsi que la décision 2004/217/CE de la Commission. 2009.
7. Règlement (CE) n° 183/2005 du Parlement européen et du Conseil du 12 janvier 2005 établissant des exigences en matière d'hygiène des aliments pour animaux. 2005.
8. Règlement (UE) no 68/2013 de la Commission du 16 janvier 2013 relatif au catalogue des matières premières pour aliments des animaux. 2013.
9. Règlement (CE) no 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux. 2003.
10. Alibert, L., *Besoins alimentaires des animaux en fonction du stade physiologique*. Alimentation des porcins en agriculture biologique, 2014. **3**.
11. Ferchaud, F.M.S., *Valeurs alimentaires des matières premières AB et limites d'incorporation*. Alimentation des porcins en agriculture biologique, 2014. **4**.
12. PCM, *Alimentation des porcs en soupes céréalières*. 2014.
13. FEFAC. *Compound Feed Production (1989-2022)*. Available from: <https://fefac.eu/> (consulté le 16/01/2023).
14. Marty, A.A.M.R.S., *INAPORC. L'interprofession de la filière porcine. Rapport*. 2017.
15. Md Ramim Tanver Rahman , I.F.a.E.B., *Insights in the Development and Uses of Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry and Swine Production*. Antibiotics, 2022.

16. Martin, A.D.C.G., *Resisting Antimicrobial Resistance: Regulating the Use of Antibiotics in EU Animal Agriculture*. European Institute for Animal Law & Policy and Jeremy Collier Foundation, 2022.
17. Règlement (UE) 2019/6 du Parlement européen et du Conseil du 11 décembre 2018 relatif aux médicaments vétérinaires et abrogeant la directive 2001/82/CE. 2018.
18. Garima Kapoor, S.S., Ashok Elongavan, *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology, 2017.
19. Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A., *Peptidoglycan structure and architecture*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(2): p. 149-67.
20. Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., and Walsh, C., *Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics*. Chemical Reviews, 2005. **105**(2): p. 425-448.
21. Eyler, R.F. and Shvets, K., *Clinical Pharmacology of Antibiotics*. Clin J Am Soc Nephrol, 2019. **14**(7): p. 1080-1090.
22. Darby, E.M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M.S., Alav, I., Webber, M.A., and Blair, J.M.A., *Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited*. Nature Reviews Microbiology, 2022.
23. Fernández-Villa, D., Aguilar, M.R., and Rojo, L., *Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(20).
24. Koulikoff, F. *Résistance aux antibiotiques. Un phénomène massif et préoccupant*. 2017; Available from: <https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/> (consulté le 26/01/2023).
25. Hélène Chardon, H.B., *Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes*. Cahiers Sécurité Sanitaire Santé Animale, 2014.
26. ANMV, *Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2021*. 2022.
27. EMA. *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) Database*. Available from: <https://esvacbi.ema.europa.eu/analytics/> (consulté le 27/01/2023).
28. Alexandre Poissonnet, I.C., Claire Chauvin, Anne Hémonic, *Panel INAPORC, suivi des usages d'antibiotiques en élevage de porcs en France entre 2010, 2016 et 2019*. Journées de la Recherche Porcine, 2022.

29. Burch, D.G.S., *Antimicrobial Drugs Used in Swine*, in *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, J.F.P. Steeve Giguère, Patricia M. Dowling, Editor. 2013.
30. Mark G. Papich, J.E.R., *Tetracycline Antibiotics*, in *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, M.G.P. Jim E. Riviere, Editor. 2018.
31. Papich, M.G., *Chloramphenicol and Derivatives, Macrolides, Lincosamides, and Miscellaneous Antimicrobials*, in *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, M.G.P. Jim E. Riviere, Editor. 2018.
32. Veyssier, P., *Aminoglycosides. Aminocyclitols*, in *Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques*, A. Briskier, Editor. 1999.
33. Mark G. Papich, *Sulfonamides and Potentiated Sulfonamides*, in *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, M.G.P. Jim E. Riviere, Editor. 2018.
34. Règlement (CE)) No 470/2009 du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale, abrogeant le règlement (CEE) n o 2377/90 du Conseil et modifiant la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n o 726/2004 du Parlement européen et du Conseil. 2009.
35. Règlement (UE) No 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. 2009.
36. Règlement (UE) 2018/782 de la Commission du 29 mai 2018 établissant les principes méthodologiques applicables à l'évaluation du risque et aux recommandations pour la gestion du risque visés dans le règlement (CE) no 470/2009. 2018.
37. Règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017 concernant les contrôles officiels et les autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation alimentaire et de la législation relative aux aliments pour animaux ainsi que des règles relatives à la santé et au bien-être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques, modifiant les règlements du Parlement européen et du Conseil (CE) no 999/ 2001, (CE) no 396/2005, (CE) no 1069/2009, (CE) no 1107/2009, (UE) no 1151/2012, (UE) no 652/2014, (UE) 2016/429 et (UE) 2016/2031, les règlements du Conseil (CE) no 1/2005 et (CE) no 1099/2009 ainsi que les directives du Conseil 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE et

- 2008/120/CE, et abrogeant les règlements du Parlement européen et du Conseil (CE) no 854/2004 et (CE) no 882/ 2004, les directives du Conseil 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE et 97/78/CE ainsi que la décision 92/438/CEE du Conseil (règlement sur les contrôles officiels). 2017.
38. Règlement délégué (UE) 2022/1644 de la Commission du 7 juillet 2022 complétant le règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil par des exigences spécifiques pour la réalisation des contrôles officiels de l'utilisation des substances pharmacologiquement actives autorisées en tant que médicaments vétérinaires ou en tant qu'additifs destinés à l'alimentation des animaux et des substances pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées et de leurs résidus. 2022.
 39. Règlement d'exécution (UE) 2021/808 de la Commission du 22 mars 2021 concernant les performances des méthodes d'analyse des résidus de substances pharmacologiquement actives utilisées chez les animaux producteurs d'aliments et l'interprétation des résultats ainsi que les méthodes à employer pour l'échantillonnage et abrogeant les décisions 2002/657/CE et 98/179/CE. 2021.
 40. Marshall, B.M. and Levy, S.B., *Food animals and antimicrobials: impacts on human health*. Clin Microbiol Rev, 2011. **24**(4): p. 718-33.
 41. Organisation mondiale de la S., *Liste OMS des antibiotiques d'importance critique pour la médecine humaine (liste CIA)*. Organisation mondiale de la Santé: Genève, 2019.
 42. Directive 2003/99/CE du parlement européen et du conseil du 17 novembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil. 2003.
 43. Décision d'exécution (UE) 2020/1729 de la Commission du 17 novembre 2020 concernant la surveillance et la présentation de rapports relatifs à la résistance aux antimicrobiens chez les bactéries zoonotiques et commensales et abrogeant la décision d'exécution 2013/652/UE. 2020.
 44. Perrin-Guyomard, A., Bruneau, M., Mourand, G., Isabelle Kempf, I., Cuzzucoli, D., and Granier, S., *Dispositif français de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries zoonotiques et commensales isolées chez les animaux d'élevage et dans les denrées alimentaires d'origine animale*. Bulletin Epidémiologique, santé animale et alimentation, 2023.

45. Résapath, *Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales. Bilan 2021*. 2022.
46. Règlement (UE) 2019/4 du Parlement européen et du conseil du 11 décembre 2018 concernant la fabrication, la mise sur le marché et l'utilisation d'aliments médicamenteux pour animaux, modifiant le règlement (CE) n o 183/2005 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 90/167/CEE du Conseil. 2018.
47. Geof Smith, J.E.R., *Dosage Forms And Veterinary Feed Directives*, in *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, M.G.P. Jim E. Riviere, Editor. 2018.
48. ANMV, *Cessions d'aliments médicamenteux contenant des antibiotiques en France*. 2021.
49. McEvoy, J.D.G., *Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control*. *Anal. Chim. Acta*, 2002. **473**: p. 3-26.
50. Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Pérez-Vendrell, A.M., Brufau, J., Medina, M., and Bosch, J., *Analysis of antimicrobial agents in animal feed*. *Trends Anal. Chem.*, 2011. **30**(7): p. 1042-1064.
51. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, *Décision du 12 février 2007 relative aux bonnes pratiques de fabrication et de distribution en gros des aliments médicamenteux*. *Journal Officiel de la République Française*, 2007.
52. Kennedy, D.G., Cannavan, A., and McCracken, R.J., *Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues*. *J Chromatogr A*, 2000. **882**(1-2): p. 37-52.
53. FAO, W., *Carryover in feed and transfer from feed to food of unavoidable and unintended residues of approved veterinary drugs*. 2019.
54. Joseph P. Harner, T.H., John Falk, Keith Behnke, *Avoiding Drug Carryover During Feed Processing and Delivery*. Cooperative Extension Service, Kansas State University. 1996
55. Filippitzi, M.E., Sarrazin, S., Imberechts, H., Smet, A., and Dewulf, J., *Risk of cross-contamination due to the use of antimicrobial medicated feed throughout the trail of feed from the feed mill to the farm*. *Food Additives and Contaminants Part A*, 2016. **33**(4): p. 644-55.

56. Stolker, A.A., Manti, V., Zuidema, T., van Egmond, H., Deckers, E.R., Herbes, R., Hooglugt, J., Olde Heuvel, E., and de Jong, J., *Carry-over of veterinary drugs from medicated to non-medicated feeds in commercial feed manufacturing plants*. Food Additives and Contaminants Part A, 2013. **30**(6): p. 1100-7.
57. Lynas, L., Currie, D., McCaughey, W.J., McEvoy, J.D.G., and Kennedy, D.G., *Contamination of animal feedingstuffs with undeclared antimicrobial additives*. Food Additives & Contaminants, 1998. **15**(2): p. 162-170.
58. Robert, C., Brasseur, P.Y., Dubois, M., Delahaut, P., and Gillard, N., *Development and validation of rapid multiresidue and multi-class analysis for antibiotics and anthelmintics in feed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Food Additives and Contaminants Part A, 2016. **33**(8): p. 1312-23.
59. Przeniosło-Siwczyńska, M., Patyra, E., Grelik, A., Chytek-Purchała, M., Kozak, B., and Kwiatek, K., *Contamination of Animal Feed with Undeclared Tetracyclines-Confirmatory Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry after Microbiological Plate Test*. Molecules, 2020. **25**(9).
60. Gaugain, M., Fourmond, M.P., Fuselier, R., Verdon, E., Roudaut, B., and Pessel, D., *Control of Antimicrobials in Feed Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Assessment of Cross-Contamination Rates at the Farm Level*. J Agric Food Chem, 2020. **68**(34): p. 9033-9042.
61. Gaugain, M., Fourmond, M.P., Roudaut, B., Fuselier, R., and Pessel, D., *Control of Antimicrobials in Feed by a LC-MS/MS Method: assessment of cross-contamination rate in pig, poultry and rabbit feed at the farm level*. Recent Advances in Food Analysis Congress, 2019.
62. Rice, D.A., McMurray, C.H., and Davidson, J.F., *Ketosis in dairy cows caused by low levels of lincomycin in concentrate feed*. Veterinary Record, 1983. **113**(21): p. 495-496.
63. Lee, M.H., Lee, H.J., and Ryu, P.D., *Public Health Risks: Chemical and Antibiotic Residues - Review*. Asian-Australas J Anim Sci, 2001. **14**(3): p. 402-413.
64. Baynes, R.E., Dedonder, K., Kissell, L., Mzyk, D., Marmulak, T., Smith, G., Tell, L., Gehring, R., Davis, J., and Riviere, J.E., *Health concerns and management of select veterinary drug residues*. Food and Chemical Toxicology, 2016. **88**: p. 112-122.

65. Beyene, T., *Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health*. Journal of Veterinary Science and Technology, 2015. **7**: p. 1-7.
66. Arsène, M.M.J., Davares, A.K.L., Viktorovna, P.I., Andreevna, S.L., Sarra, S., Khelifi, I., and Sergueïevna, D.M., *The public health issue of antibiotic residues in food and feed: Causes, consequences, and potential solutions*. Vet World, 2022. **15**(3): p. 662-671.
67. DGAL, *Surveillance sanitaire des denrées animales et végétales et des aliments pour animaux. Bilan 2021 Plans de surveillance et plans de contrôle*. 2021.
68. EFSA, Brocca, D., and Salvatore, S., *Report for 2021 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products*. EFSA Supporting Publications, 2023. **20**(2): p. 7886E.
69. Agersø, H. and Friis, C., *Bioavailability of amoxycillin in pigs*. J Vet Pharmacol Ther, 1998. **21**(1): p. 41-6.
70. P. Nielsen, N.G.-H., *Bioavailability of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline after oral administration to fed and fasted pigs*. J. vet. Pharmacol. Therap., 1996. **19**: p. 305-311.
71. Shimoda, M., Kokue, E., Suzuki, R., Hayama, T., and Vree, T.B., *Oral dosage regimen in the nonlinear pharmacokinetics of sulphadimethoxine in pigs*. Veterinary Quarterly, 1990. **12**(1): p. 7-13.
72. Nielsen, P. and Gyrd-Hansen, N., *Oral bioavailability of sulphadiazine and trimethoprim in fed and fasted pigs*. Res Vet Sci, 1994. **56**(1): p. 48-52.
73. Merchant, H.A., McConnell, E.L., Liu, F., Ramaswamy, C., Kulkarni, R.P., Basit, A.W., and Murdan, S., *Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development*. Eur J Pharm Sci, 2011. **42**(1-2): p. 3-10.
74. Li, Y., Wang, H., Liu, X., Zhao, G., and Sun, Y., *Dissipation kinetics of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline residues in soil*. Environ Sci Pollut Res Int, 2016. **23**(14): p. 13822-31.
75. Martínez-Larrañaga, M.R., Anadón, A., Martínez, M.A., Díaz, M. J., Frejo, M. T., Castellano, V. J., Isea, G., De la cruz, C. O., *Pharmacokinetics of amoxycillin and the rate of depletion of its residues in pigs*. Veterinary Record 2004. **154**: p. 627-632.

76. Mengelers, M.J., Van Gogh, E.R., Kuiper, H.A., Pijpers, A., Verheijden, J.H., and Van Miert, A.S., *Pharmacokinetics of sulfadimethoxine and sulfamethoxazole in combination with trimethoprim after intravenous administration to healthy and pneumonic pigs*. J Vet Pharmacol Ther, 1995. **18**(4): p. 243-53.
77. *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis*. Lancet, 2022. **399**(10325): p. 629-655.
78. O'Neill, J., *Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. 2016: Review on Antimicrobial Resistance.
79. O'Neill, J., *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*. 2014: Review on Antimicrobial Resistance.
80. Anses, *Antibiorésistance en santé animale. Bilan 2022*. 2022.
81. Anses, *Antibiorésistance des bactéries zoonotiques et commensales isolées chez les animaux producteurs d'aliments et leurs denrées. Bilan de surveillance 2014-2020*. 2021.
82. RESAPATH on line. Available from: <https://shiny-public.anses.fr/ENresapath2/> (consulté le 07/08/2023).
83. AFSSA, *Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine*. 2006.
84. Guardabassi, L. and Courvalin, P., *Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance*, in *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, F.M. Aarestrup, Editor. 2006. p. 1-18.
85. Reygaert, W.C., *An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria*. AIMS Microbiol, 2018. **4**(3): p. 482-501.
86. Modi, S.R., Collins, J.J., and Relman, D.A., *Antibiotics and the gut microbiota*. The Journal of Clinical Investigation, 2014. **124**(10): p. 4212-4218.
87. Walsh, C. and Wencewicz, T., *Antibiotic Resistance: Modification or Destruction of the Antibiotic*, in *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*. 2016. p. 199-218.
88. Walsh, C. and Wencewicz, T., *Resistance via Target Modification*, in *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities*. 2016. p. 231-251.
89. González, I., Georgiou, M., Alcaide, F., Balas, D., Liñares, J., and de la Campa, A.G., *Fluoroquinolone resistance mutations in the parC, parE, and gyrA genes of clinical*

- isolates of viridans group streptococci*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(11): p. 2792-8.
90. WHO. *One Health*. Available from: https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1 (consulté le 16/08/2023).
91. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). 2017.
92. A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system. 2020.
93. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, *Plan EcoAntibio 2012-2017 : lutte contre l'antibiorésistance*. Available from: <https://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio-2012-2017-lutte-contre-lantibioresistance> (consulté le 28/08/2023).
94. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, *Ecoantibio. Réduire l'utilisation des antibiotiques vétérinaires*. 2017.
95. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, *Ecoantibio 2. Plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire. 2017-2021*.
96. Guillaume, K. and Laugier, C., *Evaluation des plans Ecoantibio et appui à la préparation du troisième*. 2022, Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire.
97. OMS, *Antimicrobiens d'importance critique pour la médecine humaine*. 2018.
98. OIE, *Liste OIE des agents antimicrobiens importants en médecine vétérinaire*. 2018.
99. EMA, *Catégorisation des antibiotiques à usage vétérinaire*. 2019.
100. Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D., and Andersson, D.I., *Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations*. PLoS Pathog, 2011. **7**(7): p. e1002158.
101. Kempf, I. and Zeitouni, S., *Coût biologique de la résistance aux antibiotiques : analyse et conséquences*. Pathologie Biologie, 2012. **60**(2): p. e9-e14.
102. Andersson, D.I. and Hughes, D., *Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics*. Nature Reviews Microbiology, 2014. **12**(7): p. 465-478.
103. Sandegren, L., *Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations*. Ups. J. Med. Sci., 2014. **119**(2): p. 103-7.
104. Peeters, L.E.J., Croubels, S., Rasschaert, G., Imberechts, H., Daeseleire, E., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Butaye, P., Haesebrouck, F., and Smet, A., *Effect of residual doxycycline concentrations on resistance selection and transfer in porcine commensal Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents, 2018. **51**(1): p. 123-127.

105. Moore, J.E., Millar, B.C., Ollman-Selinger, M., and Cambridge, L., *The Role of Suboptimal Concentrations of Nebulized Tobramycin in Driving Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa Isolates in Cystic Fibrosis*. *Respir Care*, 2021. **66**(9): p. 1446-1457.
106. Lin, D., Chen, K., Xie, M., Ye, L., Chan, E.W.-C., and Chen, S., *Effect of ceftiofur and enrofloxacin on E. coli sub-population in pig gastrointestinal tract*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2017. **10**: p. 126-130.
107. Holman, D.B. and Chénier, M.R., *Impact of subtherapeutic administration of tylosin and chlortetracycline on antimicrobial resistance in farrow-to-finish swine*. *FEMS Microbiol Ecol*, 2013. **85**(1): p. 1-13.
108. Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Andersson, D.I., Bampidis, V., Bengtsson-Palme, J., Bouchard, D., Ferran, A., Kouba, M., López Puente, S., López-Alonso, M., Nielsen, S.S., Pechová, A., Petkova, M., Girault, S., Broglia, A., Guerra, B., Innocenti, M.L., Liébana, E., López-Gálvez, G., Manini, P., Stella, P., and Peixe, L., *Maximum levels of cross-contamination for 24 antimicrobial active substances in non-target feed. Part 1: Methodology, general data gaps and uncertainties*, in *EFSA Journal*. 2021. p. e06852.
109. Tessier, A., *Prendre en compte le profil génétique des patients dans la pharmacocinétique : quelles méthodes en analyse de population ?*, in *Sciences Pharmaceutiques*. Université Denis Diderot Paris 7, 2016.
110. S. Khier, E.C., *Pharmacocinétique de population : principes généraux*, in *Pharmacocinétique et développement d'un médicament*. 2018: Edimark. p. 345-356.
111. *The Concept and Basic Principles of Solid Phase Extraction*. 2018; Available from: <https://www.specartridge.com/the-concept-and-basic-principles-of-solid-phase-extraction/> (consulté le 30/05/2023).
112. Peeters, L.E., Daeseleire, E., Devreese, M., Rasschaert, G., Smet, A., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Imberechts, H., Haesebrouck, F., Butaye, P., and Croubels, S., *Residues of chlortetracycline, doxycycline and sulfadiazine-trimethoprim in intestinal content and feces of pigs due to cross-contamination of feed*. *BMC Vet. Res.*, 2016. **12**: p. 209.
113. Barbosa Da Silva, A., Back, M., Daguer, H., Palmeira, M., Antunes De Sa Ploencio, L., Molognoni, L., Peripolli, V., and Bianchi, I., *Carry-over and contamination of veterinary*

- drugs in feed production lines for poultry and pigs*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2019. **36**(5): p. 740-751.
114. Martos, P.A., Jayasundara, F., Dolbeer, J., Jin, W., Spilsbury, L., Mitchell, M., Varilla, C., and Shurmer, B., *Multiclass, multiresidue drug analysis, including aminoglycosides, in animal tissue using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(10): p. 5932-44.
115. Duelle, K.J., Nishshanka, U., and De Alwis, H.G., *An LC-MS/MS method for the determination of antibiotic residues in distillers grains*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017. **1053**: p. 81-86.
116. Fagerquist, C.K., Lightfield, A.R., and Lehotay, J., *Confirmatory and Quantitative Analysis of β -Lactam Antibiotics in Bovine Kidney Tissue by Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* Analytical Chemistry. **77**(5): p. 1473-1482.
117. Koesukwiat, U., Jayanta, S., and Leepipatpiboon, N., *Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk*. J Chromatogr A, 2007. **1149**(1): p. 102-11.
118. Chiesa, L.M., Nobile, M., Panseri, S., and Arioli, F., *Antibiotic use in heavy pigs: Comparison between urine and muscle samples from food chain animals analysed by HPLC-MS/MS*. Food Chem, 2017. **235**: p. 111-118.
119. De Alwis, H. and Heller, D.N., *Multiclass, multiresidue method for the detection of antibiotic residues in distillers grains by liquid chromatography and ion trap tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(18): p. 3076-84.
120. Song, X., Xie, J., Zhang, M., Zhang, Y., Li, J., Huang, Q., and He, L., *Simultaneous determination of eight cyclopolypeptide antibiotics in feed by high performance liquid chromatography coupled with evaporation light scattering detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018. **1076**: p. 103-109.
121. Alechaga, É., Moyano, E., and Galceran, M.T., *Mixed-mode liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of aminoglycosides in meat*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(20): p. 4941-53.
122. Deng, F., Yu, H., Pan, X., Hu, G., Wang, Q., Peng, R., Tan, L., and Yang, Z., *Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination*

- of five glycopeptide antibiotics in food and biological samples using solid-phase extraction.* J Chromatogr A, 2018. **1538**: p. 54-59.
123. Tardiveau, J., Touchais, G., Chotard-Soutif, M.-P., Lagrée, M.-P., Hurtaud-Pessel, D., Grégoire, N., Viel, A., and Laurentie, M., *A liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the quantification of spiramycin and its active metabolite neospiramycin in milk of major and minor species: Validation using the accuracy profile.* Journal of Chromatography B, 2021. **1187**: p. 123013.
124. Li, H., Smith, M.L., Chiesa, O.A., and Kijak, P.J., *Determination of sulfadimethoxine and 4N-acetylsulfadimethoxine in bovine plasma, urine, oral fluid, and kidney and liver biopsy samples obtained surgically from standing animals by LC/MS/MS.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(3): p. 237-46.
125. Matar, K.M. and Al-Refai, B., *Quantification of Colistin in Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to a Pharmacokinetic Study.* Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 8198.
126. Liu, X.M., Xu, X.L., Nie, X.M., Feng, X.S., and Zhang, F., *A holistic strategy for discovering structural analogues of drug residues in meat using characteristic structural fragments filtering by high-resolution Orbitrap mass spectrometry.* Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2020. **38**(1): p. 81-94.
127. Reyns, T., Cherlet, M., De Baere, S., De Backer, P., and Croubels, S., *Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **861**(1): p. 108-16.
128. Soulier, C., Boiteux, V., Candido, P., Caupos, E., Chachignon, M., Couturier, G., Dauchy, X., Devier, M.-H., Esperanza, M., and Aurélie Fildier, e.a., *La spectrométrie de masse haute résolution pour la recherche de micropolluants organiques dans l'environnement.* Techniques Sciences Méthodes, 2021. **6**: p. 43-54.
129. Chunang, C., Russel, D., and Yehl, P., *Application of LCMS in small-molecule drug development.* European Pharmaceutical Review, 2016.
130. Halket, J.M., Waterman, D., Przyborowska, A.M., Patel, R.K., Fraser, P.D., and Bramley, P.M., *Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS.* J Exp Bot, 2005. **56**(410): p. 219-43.

131. Cech, N.B. and Enke, C.G., *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. Mass Spectrom Rev, 2001. **20**(6): p. 362-87.
132. ISO/CEI 17025:2017, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. 2017.
133. Anses, *Guide de validation des méthodes d'analyses*. 2015.
134. Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., and Valat, L., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—part I*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. **36**(3): p. 579-586.
135. Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., and Rozet, E., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal – Part II*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **45**(1): p. 70-81.
136. Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Valat, L., and Rozet, E., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal—Part III*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **45**(1): p. 82-96.
137. Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Valat, L., and Rozet, E., *Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal part IV. Examples of application*. J Pharm Biomed Anal, 2008. **48**(3): p. 760-71.
138. Guilhaus, M., *Time of flight mass spectrometry*. Trends in Analytical Chemistry, 1995.
139. Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reily, M.D., Thaden, J.J., and Viant, M.R., *Proposed minimum reporting standards for chemical analysis*. Metabolomics, 2007. **3**(3): p. 211-221.

140. Abdollahi, M., Segura, P.A., and Beaudry, F., *Is nontargeted data acquisition for target analysis (nDATA) in mass spectrometry a forward-thinking analytical approach?* Biomed Chromatogr, 2023. **37**(7): p. e5531.
141. Winokur, P.L., Vonstein, D.L., Hoffman, L.J., Uhlenhopp, E.K., and Doern, G.V., *Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between Escherichia coli and Salmonella isolates from food animals and humans.* Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(10): p. 2716-22.
142. Wang, H.H., Manuzon, M., Lehman, M., Wan, K., Luo, H., Wittum, T.E., Yousef, A., and Bakaletz, L.O., *Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes.* FEMS Microbiol Lett, 2006. **254**(2): p. 226-31.
143. Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.J., and McDermott, P.F., *Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950-2002.* Emerg Infect Dis, 2012. **18**(5): p. 741-9.
144. Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., and Gordon, D., *The population genetics of pathogenic Escherichia coli.* Nat Rev Microbiol, 2021. **19**(1): p. 37-54.
145. Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., and Gordon, D.M., *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.* Environ Microbiol Rep, 2013. **5**(1): p. 58-65.
146. Santos-Santórum Suárez, C., Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., Hurtaud-Pessel, D., Laurentie, M., Viel, A., Taillandier, J.-F., Lagree, M.-P., and Gaugain, M., *Validation of a LC-MS/MS method for the quantitative analysis of four antibiotics in pig tissues and plasma to assess the risk of transfer of residues to edible matrices after exposure to cross-contaminated feed.* Food Additives & Contaminants: Part A, 2022. **39**(11): p. 1818-1827.
147. Mevius, D.J., Vellenga, L., Breukink, H.J., Nouws, J.F., Vree, T.B., and Driessens, F., *Pharmacokinetics and renal clearance of oxytetracycline in piglets following intravenous and oral administration.* Vet Q, 1986. **8**(4): p. 274-84.
148. Phillips, K.A., Yau, A., Favela, K.A., Isaacs, K.K., McEachran, A., Grulke, C., Richard, A.M., Williams, A.J., Sobus, J.R., Thomas, R.S., and Wambaugh, J.F., *Suspect Screening Analysis of Chemicals in Consumer Products.* Environ Sci Technol, 2018. **52**(5): p. 3125-3135.

149. Grashow, R., Bessonneau, V., Gerona, R.R., Wang, A., Trowbridge, J., Lin, T., Buren, H., Rudel, R.A., and Morello-Frosch, R., *Integrating Exposure Knowledge and Serum Suspect Screening as a New Approach to Biomonitoring: An Application in Firefighters and Office Workers*. *Environ Sci Technol*, 2020. **54**(7): p. 4344-4355.
150. Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reily, M.D., Thaden, J.J., and Viant, M.R., *Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI)*. *Metabolomics*, 2007. **3**(3): p. 211-221.
151. Mengelers, M.J.B., Van Gogh, E.R., Huveneers, M.B.M., Hougee, P.E., Kuiper, H.A., Pijpers, A. Verheijden, J.H.M. and Van Miert, A.S.J.P.A.M., *Pharmacokinetics of Sulfadimethoxine and Sulfamethoxazole in Combination with Trimethoprim after Oral Single- and Multiple-Dose Administration to Healthy Pigs*. *Veterinary Research Communications*, 2001. **25**: p. 461-481.
152. Linkenheimer, W.H., Stolzenberg, M.S., *Pharmacologic Characteristics of 4 Sulfonamides in Swine*. *American Journal of Veterinary Research*, 1965. **26**(114): p. 1086-1094.

Annexe

Supplementary data de l'article 2

Supplementary Table 1. Feed composition

Feed composition
Raw protein
Raw fat
Raw cellulose
Raw ashes
Lysine
Methionine
Calcium
Phosphor sodium
Potassium

Supplementary Table 2. LLOQ-ULOQ interval, recovery, relative repeatability, relative intermediate precision, recovery, accuracy index and relative expanded uncertainty for each analyte in each matrix

Compound	Matrix	LLOQ-ULOQ (ng/mL or ng/g)*	Recovery (%)	Relative repeatability (VC, %)	Relative intermediate precision (VC, %)	Accuracy index	Relative expanded uncertainty (%)
SDMT	Plasma	10-1000	97.67-100.6	2.39-3.42	2.93-3.42	0.872	5.52-7.51
	Muscle	10-1000	98.99-100.6	0.36-1.55	0.96-1.76	0.947	2.16-3.85
	Liver	16.31-1000	91.22-99.43	0.30-3.42	1.41-5.99	0.923	3.05-30.12
	Kidney	10-1000	97.95-102.2	0.58-3.6	0.58-3.82	0.886	1.26-8.32
	Faeces	20-1000	98.2-100.8	0.95-4.01	1.52-4.01	0.871	3.43-20.03
TMP	Plasma	10-1000	97.17-101.1	1.21-2.73	1.8-3.02	0.863	3.89-6.74
	Muscle	10-1000	97.64-102.2	0.81-2.65	0.81-2.80	0.948	1.76-6.10
	Liver	10-1000	97.3-102.2	0.85-13.87	1.76-13.87	0.911	3.79-29.95
	Kidney	10-1000	95.53-102.5	0.35-4.15	1.03-4.15	0.867	2.35-7.05
	Faeces	20-1000	96.97-99.83	1.04-3.65	1.82-8.00	0.866	4.13-18.37

* LLOQ-ULOQ: Lower limit of quantification-upper limit of quantification

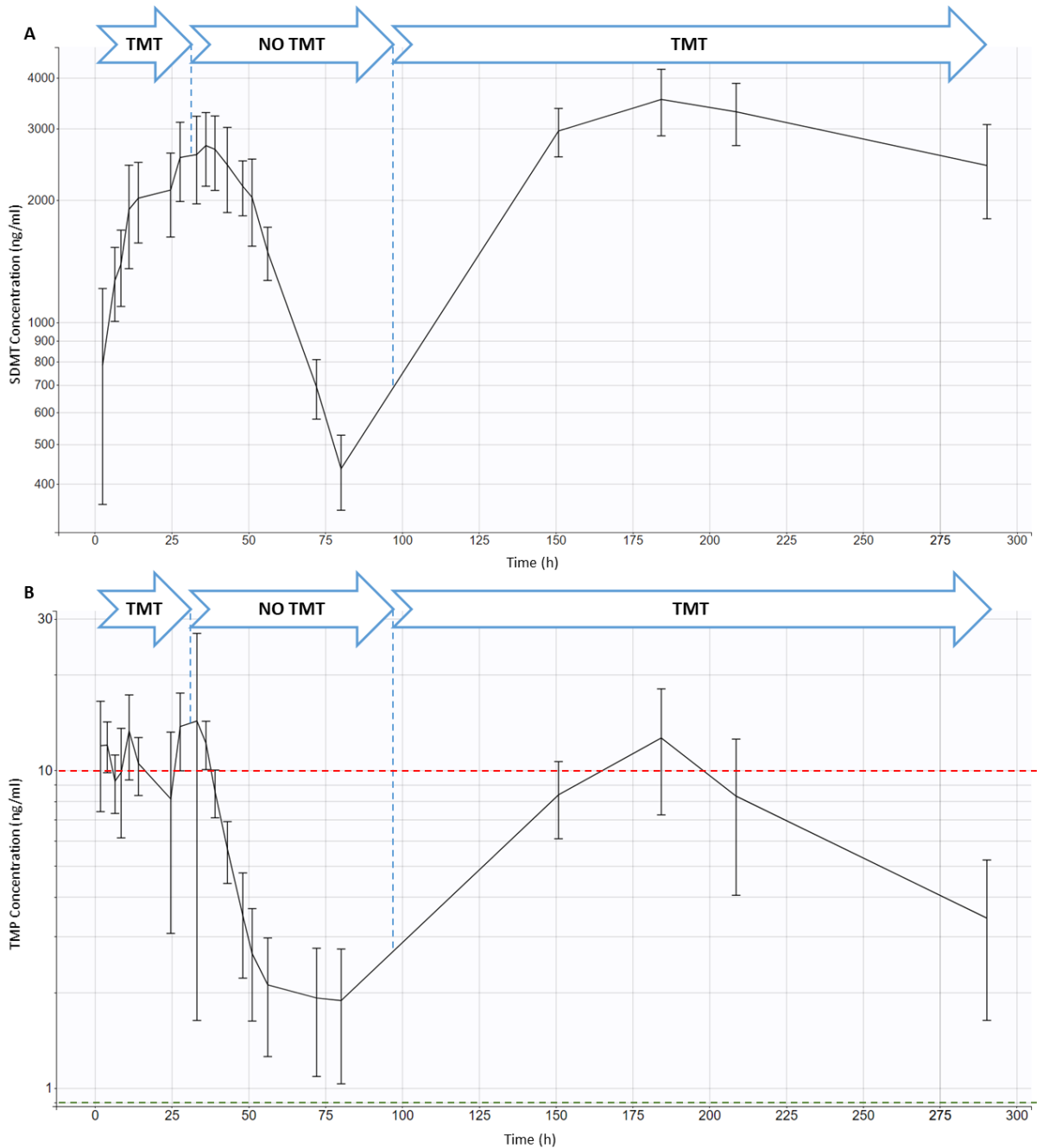
Supplementary Table 3. Targeted transformation phase I and phase II metabolites

	Transformation	Formula
<i>Phase I metabolites</i>	2 x Desaturation	-H4
	2 x Oxidation	+O2
	2 x Oxidation + Desaturation	-H2 +O2
	3 x Oxidation	+O3
	Decarbonylation	-CO
	Decarboxylation	-COO
	Deethylation	-C2H4
	Dehydration	-H2O
	Demethylation	-CH2
	Desaturation	-H2
	Dihydrodiol formation	+H2O2
	Ethyl ketone to acid	-C3H6+O
	Hidration	+H2O
	Isopropyl to alcohol	-C3H6+O
	Nitro reduction	-O2H2
	Oxidation	+O
	Oxidation + desaturation	+O-H2
	Reduction	+H2
	Propyl ketone to acid	-C4H8+O
	Tert-butyl to alcohol	-C4H8+O
<i>Phase II metabolites</i>	Acetyl cysteine conjugation	+C5H7NO3S
	Acetylation	+C2H2O
	Butyryl conjugation	+C4H6O
	Carnitine conjugation	+C7H14O2N
	CysGlys S adduction	+C5H8N2O3S
	Cysteine conjugation	+C3H5NOS
	Cysteine S-conjugation	+C3H5NO2S
	Formylation	+CO
	Glucuronidation	+C6H8O6

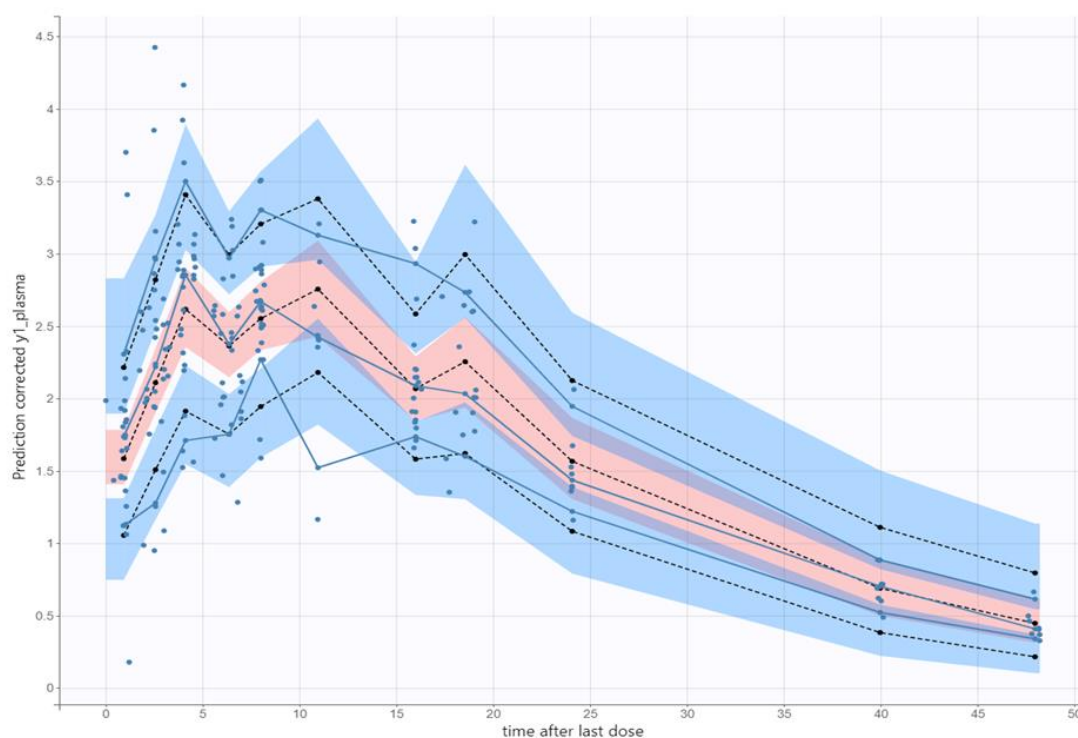
Annexe

Glucosylation		+C6H10O5
Glucuronidation	of	+C7H8O8
carbamate		
Glutamine conjugation		+C5H7O3N
Glutathione conjugation		+C10H15N3O5S
Glutathione S-conjugation		+C10H15N3O6S
Glycine conjugation		+C2H3NO
Methylation		+CH2
Phosphorylation		+HPO3
Propionyl conjugation		+C3H4O
Sulfation		+SO3
Taurine conjugation		+C2H5NO2S

Supplementary figure 1. Mean SDMT (A) and TMP (B) concentrations in plasma (ng/ml, in log scale) and SD (error bar) for the 8 pigs. The red line represents the lower limit of quantification (LLOQ=10 ng/ml) and the green one represents the limit of detection (LOD=0.094 ng/ml) of the analytical method. TMT = treatment period



Supplementary figure 2. Visual predictive checks (VPCs) of the model with 500 simulations and a 90% prediction interval



Supplementary Table 4. Individual concentrations of sulphadimethoxine in pig tissues and plasma at time of slaughter

Pig	Muscle concentration (mean of loin and leg) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Liver concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Kidney concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Plasma concentration (ng/ml)
Pig 1	172.03	583.26	610.49	1704.78
Pig 2	158.26	550.87	437.46	2003.5
Pig 3	179.97	560.33	427.24	2759.68
Pig 4	198.68	576.75	508.43	2688.02
Pig 5	209.16	698.67	588.75	3510.47
Pig 6	203.27	721.70	565.60	1739.47
Pig 7	218.13	759.75	499.02	2902.07
Pig 8	161.39	492.13	441.83	2158.13

Titre : Contamination croisée des aliments pour animaux par les antibiotiques : évaluation du transfert vers les denrées d'origine animale et risque de sélection d'antibiorésistance

Mots clés : antibiotiques, contamination croisée, aliments pour animaux, résidus, antibiorésistance

Résumé : Lors de la fabrication des aliments pour animaux, une contamination croisée peut se produire entre les aliments médicamenteux et les non médicamenteux, ce qui peut emmener à la présence non maîtrisée d'antibiotiques dans ces derniers. L'exposition des animaux à des faibles concentrations d'antibiotiques questionne sur les risques d'un potentiel transfert de résidus vers les denrées d'origine animale, ainsi que d'une possible sélection d'antibiorésistance. L'objectif de ces travaux de thèse a été d'étudier ces deux risques.

Le risque de résidus dans les denrées d'origine animale a été évalué à travers des expérimentations animales où des porcs ont été exposés à un aliment contaminé à des taux tolérés par les Bonnes Pratiques de Fabrication.

Les antibiotiques étudiés ont été l'association sulfadiméthoxine/triméthoprime et l'oxytétracycline. Des échantillons de plasma, de fèces et de tissus ont été prélevés et dosés.

Pour étudier le risque de sélection d'antibiorésistance, une expérimentation animale a été faite sur deux groupes de porcs, un groupe témoin et un groupe recevant l'oxytétracycline aux taux de contamination acceptés. Des prélèvements fécaux ont été effectués avant et pendant le traitement afin d'étudier l'évolution des populations *E. coli* totales et résistantes.

Les résultats de ces travaux montrent le besoin de limiter l'exposition des animaux à des aliments contaminés du fait du risque de dépassement des Limites Maximales de Résidus dans les denrées, ainsi que de sélection d'antibiorésistance.

Title: Antibiotic cross-contamination of feedingstuffs: assessment of transfer to food of animal origin and risk of selection of antibiotic resistance

Keywords: antibiotics, cross-contamination, animal feedstuff, residues, antibiotic resistance

Abstract: During fabrication of animal feed, cross-contamination can occur between medicated and non-medicated feed. This may lead to the uncontrolled presence of antibiotics in feed. The exposure of animals to low concentrations of antibiotics involves several risks such as the transfer of residues to food of animal origin, as well as the possible selection of antibiotic resistance. The objective of this thesis work was to study these two risks.

To assess the risk of residues in edible products two animal experiments were carried out in which pigs were exposed to contaminated feed at contamination rates tolerated by Good Manufacturing Practices. The antibiotics were either the sulphadimethoxine/trimethoprim association either oxytetracycline.

Plasma, faeces and tissue samples were collected and analysed.

To study the risk of selection of antibiotic resistance, an animal experiment was carried out on two groups of pigs, a control one and a group receiving oxytetracycline at the tolerated contamination levels. Faecal samples were taken before and during treatment to study the evolution of total and resistant *E. coli* populations.

Our results show the need to limit the exposure of animals to contaminated feed due to the risk of exceeding the Maximum Residue Limits in edible products, as well as of selection of antibiotic resistance.