

# **PLAN**

## **INTRODUCTION**

### **1- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

- 1.1- Les lésions au point d'injection
- 1.2- Les différentes méthodes d'évaluation des lésions musculaires au point d'injection
- 1.3 – La créatine kinase comme marqueur cellulaire
- 1.4 – La phénylbutazone

### **2-OBJECTIFS**

### **3- MATÉRIELS ET MÉTHODES**

- 3.1 – Plan expérimental
- 3.2 – Les animaux et leur entretien
- 3.3 – La substance test
- 3.4 – Prélèvements
- 3.5 – Dosages
- 3.6 – Méthodes pharmacocinétiques
- 3.7 – Calcul de la masse de muscle lésé
- 3.8 – Méthodes statistiques

### **4-RESULTATS**

- 4.1 – Profil plasmatique de la créatine kinase
- 4.2 – Cinétique plasmatique de la phénylbutazone
- 4.3 – Pharmacocinétique de l'oxyphenbutazone
- 4.4 – Etude de l'effet volume sur les valeurs d'AUC et de Cmax
- 4.5 – Quantification des lésions musculaires

**5-DISCUSSION**

**CONCLUSION**

**BIBLIOGRAPHIE**

**LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES**

**ANNEXES**

**TABLE DES MATIERES**

# INTRODUCTION

La voie intramusculaire est très intéressante en médecine vétérinaire car elle permet de maîtriser à la fois la dose administrée et la durée d'action du principe actif. Cependant elle présente un inconvénient majeur qui est l'intolérance locale à certains composés. En effet les injections intramusculaires provoquent généralement des lésions musculaires souvent irréversibles et les muscles concernés sont presque toujours saisis à l'abattoir. Outre la perte économique engendrée, cette voie présente aussi très souvent des réactions douloureuses qui ne sont pas acceptables du point de vue éthique, surtout par les propriétaires d'animaux de compagnie.

Pour augmenter la tolérance locale des produits injectés, il est nécessaire de disposer de moyens d'étude des effets de ces injections. La méthode la plus fiable à l'heure actuelle demeure l'examen anatomopathologique. Mais c'est une méthode chère et très discutable sur le plan éthique car elle nécessite l'euthanasie d'un grand nombre d'animaux. Il serait donc intéressant de développer une méthode la moins invasive possible, tout en restant fiable et peu onéreuse. Dans cette optique les marqueurs biochimiques semblent être de bons candidats. Le plus spécifique de ces marqueurs est assurément la créatine kinase. Des études ont permis de proposer des équations permettant de calculer la quantité de muscle lésé et donc de comparer l'intolérance de différentes substances (Lefebvre 1994, Houpert et coll., 1995, Lefebvre et coll., 1996, Ferré et coll., 2001).

L'étude des lésions intramusculaires iatrogènes par suivi d'un marqueur plasmatique, la créatine kinase, est une méthode non invasive qui répond aux besoins des professionnels du médicament, confrontés aux problèmes d'éthique et de protection animale. En effet elle ne nécessite pas l'euthanasie des animaux et elle peut être réalisée plusieurs fois sur un même animal, ce qui réduit le nombre d'individus utilisés. Comme elle est éthique, il est possible de la réaliser sur les espèces cible. Ceci est particulièrement important pour les animaux de compagnie chez qui l'euthanasie pour examen anatomopathologique ne peut pas

être justifiée par une étude de résidus. Il est par contre nécessaire de comparer les résultats anatomopathologiques pour valider la méthode.

Pour l'instant, cette méthode est surtout utilisée comme screening car elle est peu chère mais la possibilité de la rendre quantitative se heurte aux variations importantes de réponse interindividuelle. Il faudrait utiliser toujours la même méthode de dosage et déterminer les paramètres pharmacocinétiques de chaque individu à chaque étude réalisée pour s'affranchir de ces variations. Il serait alors possible de l'utiliser comme remplacement de l'étude anatomopathologique, d'autant plus qu'elle permet un suivi de la réponse dans le temps contrairement à l'analyse post-mortem qui n'est que ponctuelle. Le seul intérêt de l'examen direct de la lésion serait alors l'aspect qualitatif de celle-ci car les marqueurs endogènes ne fournissent aucune indication sur l'intensité ou l'étendue des lésions musculaires.

Par contre, l'extrapolation à l'homme est impossible car l'injection intramusculaire d'un extrait musculaire est inconcevable et les paramètres pharmacocinétiques de la créatine kinase humaine sont de ce fait inaccessibles. Cependant l'étude de la relation entre AUC et lésion musculaire est suffisante pour pouvoir comparer l'effet de formulations différentes d'un même produit.

Parmi les facteurs déterminant l'étendue et l'intensité de la lésion musculaire, le volume du médicament injecté (à concentration constante) joue un rôle majeur (Löw et coll., 1971, Svendsen et Blöm, 1984). Plus le volume injecté est élevé, plus la lésion est étendue. Une relation linéaire entre ces deux paramètres a été montrée chez le rat (Löw et coll., 1971). Une proportionnalité entre l'AUC et le volume injecté est donc probable. Nous nous proposons donc dans cette étude de vérifier cette proportionnalité.

La brebis a été retenue pour notre étude car elle est facile à manipuler et présente un niveau de base en créatine kinase plasmatique qui ne varie pas au cours du temps. La phénylbutazone, un anti-inflammatoire non stéroïdien, a déjà été utilisée chez cette espèce dans le cadre du laboratoire pour les études de

tolérance (Houpert et coll., 1995) et sera retenue comme substance test dans cette étude car elle provoque d'importantes lésions musculaires et parce qu'elle n'a pas d'effet systémique sur l'activité plasmatique de la créatine kinase (Houpert et coll., 1995).

Après une synthèse bibliographique sur les injections intramusculaires et les méthodes d'évaluation des injections puis sur la créatine kinase et la phénylbutazone, le plan expérimental sera présenté en détail, suivi des résultats obtenus et d'une discussion, qui permettra de conclure sur l'influence du volume d'injection.

# **1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **1.1. LES LÉSIONS AU POINT D'INJECTION**

### ***1.1.1. AVANTAGES DES INJECTIONS INTRAMUSCULAIRES***

Les formes injectables sont très largement utilisées chez les bovins, porcins et ovins. Cela est dû au fait que l'administration est plus aisée par voie intramusculaire que par voie orale. De plus cela permet de court-circuiter le rumen, siège de nombreuses biotransformations bactériennes capables de dégrader la plupart des principes actifs. Enfin, de cette manière, la quantité de produit effectivement administrée est parfaitement maîtrisée.

Parmi les formes injectables, la voie la plus utilisée est la voie intramusculaire. Il est beaucoup plus facile pour le vétérinaire, et pour l'éleveur parfois, de traiter une vache avec une seringue qu'en lui ouvrant la bouche !

De plus la biodisponibilité de la voie intramusculaire est souvent bonne et il est possible de modifier et contrôler la durée d'action du principe actif, grâce à ce que l'on appelle les formes « retard » ou « longue action ».

### ***1.1.2. INCONVENIENTS DES INJECTIONS INTRAMUSCULAIRES***

Le principal inconvénient est lié aux lésions provoquées par les injections. Même si généralement les injections sont pratiquées dans des muscles de faible valeur commerciale, les dégâts tissulaires sont toujours importants et irréversibles, surtout pour les formes retard, qui sont très couramment utilisées sur les animaux de rente (antibiotiques, ...). Les tissus lésés par les produits injectés font l'objet de saisies par les techniciens des services vétérinaires des abattoirs. La douleur causée à l'animal par des produits irritants représente en outre un problème éthique. La possibilité d'évaluer les lésions tissulaires au cours du développement de nouvelles formulations permettrait de diminuer le pouvoir irritant des formes injectables.

Chez l'homme, le problème est identique. Selon une étude menée par Greenblatt et coll. (1978) sur 26294 patients, 46 % d'entre eux avaient reçu au moins une injection intramusculaire et 0.4 % d'entre eux ont présenté des effets indésirables (douleur, abcès,...) suite à l'injection.

### **1.1.3. FACTEURS RESPONSABLES DES LÉSIONS**

#### **1.1.3.1. La formulation**

Certains principes actifs, comme l'oxytétracycline (Nouws et coll., 1990) et la vitamine E (Dickson et coll., 1986) présentent une myotoxicité importante chez le mouton. Ils sont irritants et provoquent une lyse des cellules et donc un relargage de créatine kinase. Par contre un soluté isotonique de chlorure de sodium est parfaitement toléré et ne provoque aucune lésion (Sidell et coll., 1974). Il sert ainsi de témoin de tolérance aux injections intramusculaires *in vivo*.

Les excipients employés peuvent aussi être toxiques pour le muscle. Rasmussen (1978) a remarqué que les formulations contenant du glycéraldéhyde ou du propylène glycol causaient de sévères dommages musculaires au point d'injection (Steiness et coll., 1974, 1977, 1978 ; Rasmussen et Svendsen, 1976, Blom et Rasmussen, 1976). Brazeau et Fung (1989) suggèrent que la présence de polyéthylène glycol 400 dans un mélange de cosolvants aurait un effet protecteur sur les cellules musculaires vis à vis des lésions induites par les administrations intramusculaires (résultats obtenus *in vitro*).

### **1.1.3.2. Les paramètres physicochimiques**

Le volume et la concentration jouent un rôle important dans les lésions iatrogènes lors d'injections intramusculaires (Sidell et coll., 1974, Svendsen et Blöm, 1984). Nouws (1984) a démontré, chez le porc, une relation linéaire entre le volume injecté et le poids de muscle lésé. Shintani et coll. (1967) ont noté que les injections répétées sur un même site étaient néfastes. La formule la mieux adaptée serait en fait un compromis entre concentration et volume. Soit un faible volume très concentré (Svendsen et Blöm, 1984), soit un grand volume mais peu concentré (Nouws, 1984). Par ailleurs il semble préférable que le produit soit à une température proche de la température physiologique de l'animal lors de l'injection (Mevius et coll., 1986).

### **1.1.3.3. Le matériel et les méthodes d'injection**

L'injection doit être réalisée avec une aiguille dont la longueur est adaptée à l'épaisseur musculaire du site de manière à déposer le produit au centre du muscle et ne pas risquer de léser l'os ou des nerfs pouvant se trouver derrière le muscle, et dont le diamètre est adapté au volume à injecter et à la viscosité du produit. Aucune étude n'a été réalisée sur le site d'injection à utiliser préférentiellement chez la brebis. Pour les bovins, il a été constaté que le meilleur site se situait dans l'encolure car la biodisponibilité y est équivalente à celle des masses glutéales, l'accès est facile, les éventuelles lésions sont bien visibles et faciles à parer et la dépréciation est minime (Nouws et Vree, 1983). Le seul problème est la faible épaisseur des muscles à cet endroit, qui peut entraîner des administrations intermusculaires. Ceci n'est pas souhaitable car la biodisponibilité peut chuter alors car une administration intermusculaire est très voisine d'une injection sous-cutanée sur le plan pharmacocinétique.



## **1.2. LES DIFFERENTES METHODES D'EVALUATION DES LESIONS MUSCULAIRES AU POINT D'INJECTION**

### **1.2.1. METHODES INVASIVES**

#### **1.2.1.1. L'examen anatomopathologique**

Pendant très longtemps, la seule méthode envisageable pour évaluer le pouvoir irritant d'une formulation intramusculaire a été l'examen anatomopathologique. Il nécessite l'euthanasie des animaux étudiés et la dissection des muscles injectés. On note ensuite les différents caractères observés : couleur, taille, aspect (très variable : cuit, hémorragique, ...). Le problème majeur de cette méthode, outre la question éthique qu'elle soulève, est que l'évaluation est le plus souvent qualitative et surtout très subjective car liée aux impressions de l'observateur. Il n'est pas possible d'évaluer quantitativement les lésions réelles car les signes visuels n'indiquent pas forcément une lésion des cellules musculaires sous-jacentes (possibilité d'épanchement, d'hématome étendu,...). Nouws et coll. (1990) ont cependant proposé un tableau d'index permettant une évaluation semi-quantitative de l'irritation du muscle au site d'injection, qui peut permettre de classer les produits testés en fonction de leur tolérance. Cet index est présenté dans le tableau 1.

L'histologie est intéressante pour compléter l'examen macroscopique car elle permet une approche microscopique (Cioc et Von Schilling., 1965). Ainsi il devient possible de différencier une zone macroscopiquement modifiée réellement lésée ou seulement modifiée macroscopiquement par une lésion voisine. Mais cette méthode est au mieux semi-quantitative car, au même titre que l'examen macroscopique, elle se base sur des caractères visuels et est liée nécessairement à l'appréciation de l'observateur. Des index ont également été établis pour les critères microscopiques observés qui traduisent la toxicité du produit vis à vis des cellules musculaires : nécrose, turgescence cytoplasmique, vacuolisation, minéralisation, présence de macrophages, prolifération de fibroblastes ...

La planimétrie permet de calculer des volumes, en additionnant les surfaces des différentes coupes de la lésion multipliées par l'épaisseur de coupe. L'inconvénient majeur de cette méthode est la difficulté à délimiter les contours, qui sont parfois très flous ou irréguliers, ce qui rend la technique trop approximative. Il est cependant possible d'augmenter la précision des mesures en augmentant le contraste entre les zones lésées et les zones saines, à l'aide d'une coloration témoignant de l'activité normale des cellules (méthodes histochimiques). Par exemple le bleu de tétrazolium, un indicateur d'oxydoréduction, colore en bleu les tissus ayant une activité déshydrogénase normale, donc les tissus non lésés, alors que les tissus nécrotiques ne sont pas colorés (Labbe et coll., 1988).

#### **1.2.1.2. Etude sur muscle isolé**

Brazeau et Fung ont développé une méthode également intéressante, basée sur une préparation de muscle isolé de rat (Brazeau et Fung., 1989). La méthode consiste à mesurer la quantité de créatine kinase relarguée dans le milieu nutritif à 37°C au bout de deux heures et à la comparer à celle du muscle controlatéral. Les muscles prélevés dans leur expérience étaient les extenseurs longs des doigts. Le principal avantage de cette méthode est le fait que tout peut être standardisé. Ils avaient ainsi mis au point un dispositif permettant de contrôler la profondeur et l'angle d'injection, ainsi que le volume, de quinze microlitres seulement. Cette méthode est intéressante pour réaliser des screenings car elle est peu onéreuse, simple, rapide, quantitative et standardisable. Leurs résultats sont comparables à ceux des tests *in vivo* chez l'homme et l'animal mais seulement pour quelques principes actifs étudiés et les méthodes *in vivo* restent donc indispensables.

| Signe | Aspect macroscopique au site d'injection  | Aire lésée en cm <sup>2</sup> |                 |
|-------|---|-------------------------------|-----------------|
|       |   | Veaux                         | Moutons / Porcs |
| -     | Aucune irritation.  | -                             | -               |
| +     | Peu d'œdème et d'hémorragie, impression de réparation.  | <20                           | <20             |
| ++    | Oedème, tissu fibro-angioplastique et hémorragies intermusculaires, dégénération ou nécrose localisée   | 20-50                         | 20-30           |
| +++   | Plus étendu que le premier  | 50-80                         | 30-40           |
| ++++  | Œdème étendu, tissu fibro-angioplastique, hémorragies et dégénération musculaire, ou nécrose bien définies avec zone de démarcation ou abcès. | >80                           | >40             |

Tableau 1 : Index d'irritation tissulaire au site d'injection.  
(traduit de Nouws et coll. 1990)

Le principal problème des méthodes invasives est finalement leur inaptitude à fournir des résultats quantitatifs, en plus du fait qu'elles nécessitent l'euthanasie d'un grand nombre de sujets, ce qui augmente grandement leur coût et pose de plus en plus de problèmes aux chercheurs à l'heure actuelle à cause de la prise de conscience éthique du public et des milieux scientifiques. De plus, des différences interspécifiques ne rendent pas ces méthodes extrapolables à l'homme et de ce fait elles perdent une grande partie de leur intérêt. Par exemple, Ladage et coll. (1979) ont montré que l'injection intramusculaire de chloramphénicol provoque d'importantes lésions chez les bovins et des lésions moindres chez le rat. Nouws et coll. (1990) ont montré que les moutons tolèrent mieux les injections d'oxytétracycline et présentent des irritations moins étendues que les veaux ou les porcs.

## **1.2.2. METHODES NON INVASIVES**

### **1.2.2.1. Imagerie**

L'échographie apparaît très intéressante. L'échogénicité du muscle augmente en effet en cas de lésion tissulaire et il est possible de mesurer cette variation. Mais il a été montré que la mesure des lésions au point d'injection était systématiquement sous-estimée, avec en plus un coefficient de variation supérieur à 60 % (Ferré et coll., 2001). Même si elle est totalement indolore, cette méthode n'est donc pas utilisable pour des évaluations quantitatives ; l'analyse pharmacocinétique de la créatine kinase donnant des résultats beaucoup plus performants.

### **1.2.2.2. Marqueurs biochimiques**

Les cellules musculaires renferment plusieurs molécules qui pourraient être utilisées comme marqueurs de lyse. Ce sont plusieurs enzymes (créatine kinase, pyruvate kinase, aspartate amino transférase, alanine amino transférase, lactate déshydrogénase et aldolase), quelques molécules originaires des myofibrilles (troponine, myosine) et la myoglobine. Ils ont d'abord été utilisés

en médecine humaine pour évaluer les lésions cardiaques, mais ils peuvent être utilisés pour les lésions musculaires s'ils possèdent des formes plus spécifiques du muscle squelettique que du muscle cardiaque. Parmi les enzymes intéressantes, la lactate déshydrogénase et l'aspartate amino transférase n'ont pas été retenues à cause de leur manque de spécificité. Il apparaît donc que l'enzyme la plus intéressante, de par sa spécificité et sa sensibilité plus importantes, est la créatine kinase. Nous allons donc l'étudier plus en détail, dans le chapitre suivant. Il existe également des marqueurs non enzymatiques comme la troponine et la myoglobine mais ils ne sont pas retenus. La troponine reviendrait trop cher car elle nécessite le développement d'anticorps spécifiques des isoformes du muscle squelettique. La myoglobine pourrait par contre être exploitable ; elle présente une spécificité comparable à celle de la créatine kinase (Astier-Théfenne et coll., 2001).

### **1.3. LA CREATINE KINASE COMME MARQUEUR CELLULAIRE**

#### **1.3.1. RAPPELS BIOCHIMIQUES**

##### **1.3.1.1. Structure de la créatine kinase**

La créatine kinase est une enzyme dimérique cytosolique. Il existe deux sous unités différentes, de 40 kDa, nommées M (type Muscle) et B (type Brain). On obtient donc les 3 isoenzymes suivantes, par combinaisons de ces sous-unités (Kaneko et coll., 1997) :

La CK-BB ou CK 1, localisée majoritairement dans le cerveau

La CK-MB ou CK 2, que l'on trouve chez l'homme dans le myocarde

La CK-MM ou CK 3, qui est présente surtout dans le muscle strié.

Il existe également dans les mitochondries une créatine kinase qui est composée de deux à huit sous-unités «Mi ».

### 1.3.1.2. Rôle physiologique

D'après l'International Union of Biochemistry, la créatine kinase est référencée E.C. 2.7.3.2. C'est donc une transférase (classe 2) qui transfère du phosphate (sous-classe 7). Son nom complet est ATP : Creatine N-Phosphotransférase (Hørder et coll. 1991). Elle intervient dans le stockage d'énergie en créant une molécule dite phosphagène, la créatine phosphate, par la réaction de Lohman (Figure 1) (Murray et coll., 1995). Ainsi la créatine kinase est une des cinq sources d'ATP du muscle, avec la glycolyse, la glycogénolyse anaérobie, la phosphorylation oxydative et la myoadénylate kinase ( $2 \text{ ADP} + \text{Pi} \longleftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ).

En effet, l'ATP est la principale source d'énergie du métabolisme puisque l'hydrolyse de sa liaison anhydride phosphorique pour former de l'ADP libère une importante quantité d'énergie libre ( $\Delta G^{\circ} = -30.5 \text{ kJ/mol}$ ). L'ATP est donc un donneur immédiat d'énergie libre mais il ne peut pas être stocké car son turnover est très élevé ; un homme au repos consomme environ 40 kg d'ATP par jour et au cours d'un exercice intense cette consommation peut atteindre 0.5 kg/minute (Stryer, 1997) alors que la concentration en ATP dans les muscles varie entre 2 et 5 mM (Wallimann et coll., 1992).

De plus, la réaction catalysée par la créatine kinase est réversible. Elle procure de l'ATP au muscle mais elle permet également de reconstituer les réserves de phosphocréatine, une fois l'effort terminé. Ainsi, créatine kinase et ATP sont les deux acteurs principaux de la contraction musculaire (Figure 2).

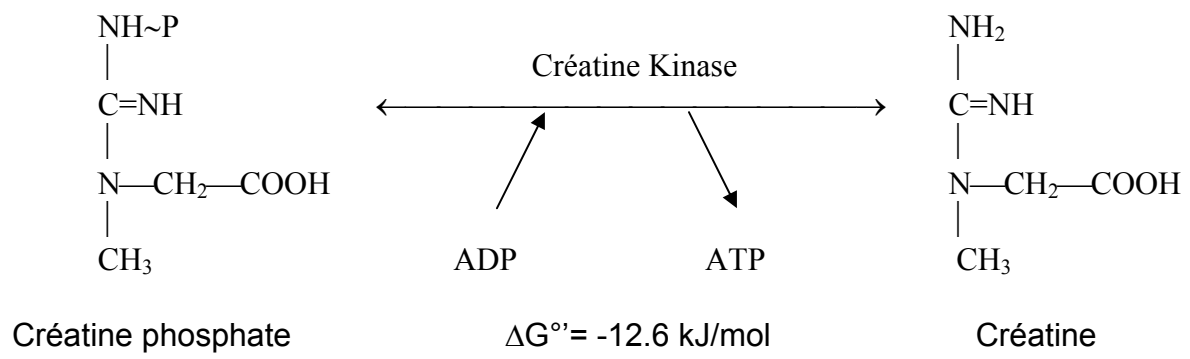


Figure 1 : Réaction de Lohman.

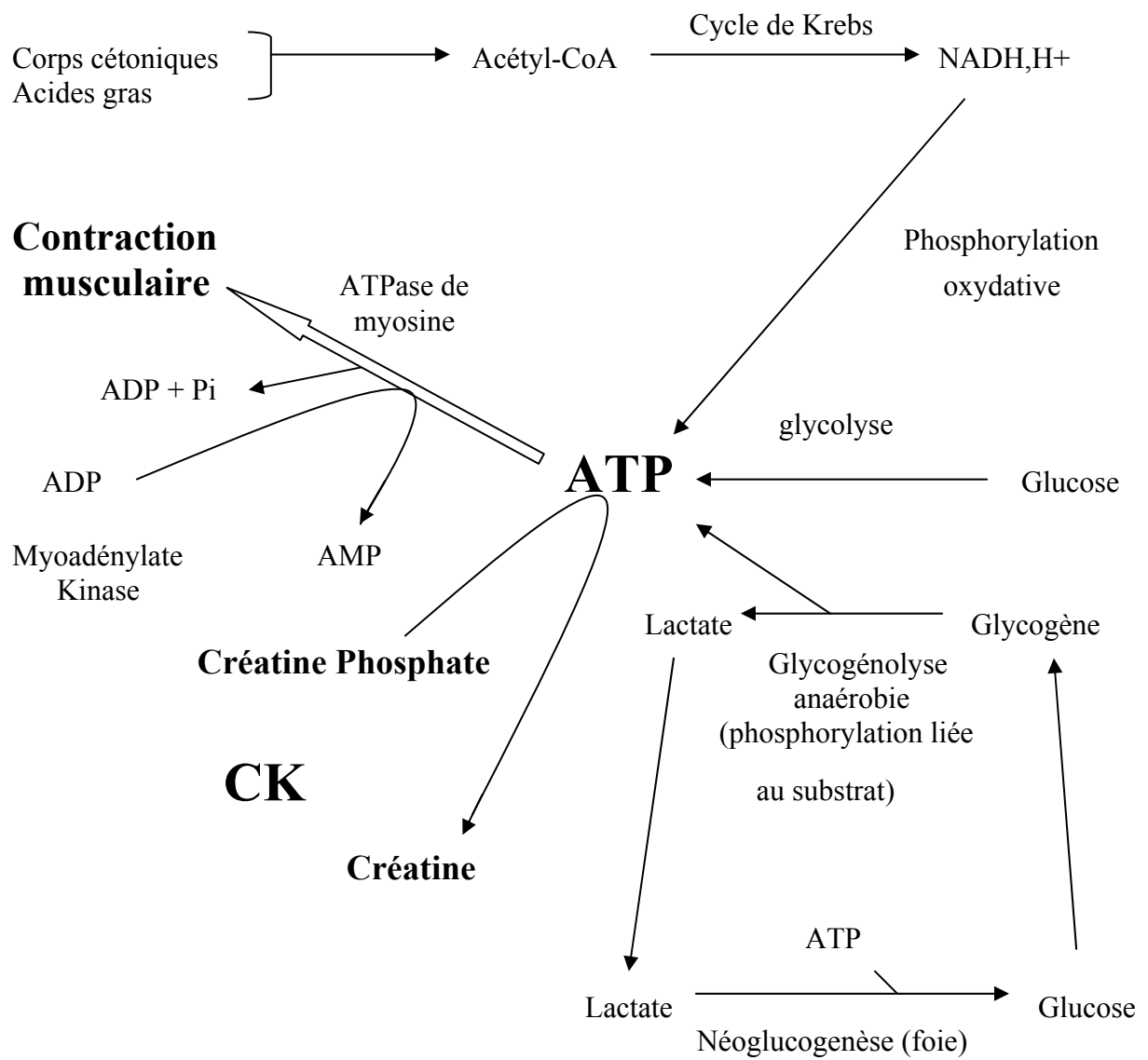


Fig. 2 : Schéma de synthèse du métabolisme énergétique du muscle squelettique.  
 (D'après Lehninger et coll. 1994)



### **1.3.2. STABILITE**

Payrière et coll. (1991) ont montré que l'activité plasmatique de la créatine kinase avant centrifugation était stable à température ambiante pendant au moins 3.5 h chez le chien et le cheval. L'hémolyse n'a aucun effet chez le cheval ; par contre, chez le chien, une faible concentration en hémoglobine (0.16 mmol/l) multiplie l'activité par 1.45. Verlinde et coll. (1996) ont mis en évidence une augmentation significative de l'activité plasmatique de la créatine kinase chez la brebis due à l'hémolyse. Ils ont émis l'hypothèse qu'elle était due à une libération d'enzyme par les plaquettes. Ce phénomène est connu aussi chez le chien (Payrière et coll., 1991) et chez l'homme (Hørder et coll., 1991). Fayolle et coll. (1992) ont montré que l'utilisation d'un vacutainer ou d'une seringue ne modifiait pas les résultats obtenus chez le chien et le cheval.

### **1.3.3. METHODES DE DOSAGE DE LA CRÉATINE KINASE PLASMATIQUE**

La méthode couramment utilisée est celle préconisée par l'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) dont le principe est présenté sur la figure 3 (Hørder et coll., 1991) . Biomérieux a commercialisé un kit de réactifs utilisable sur automate (référence n°6.315,1). La composition de ce kit est donnée dans le tableau 2, avec le rôle de chacun des constituants. Cette méthode présente l'avantage d'être rapide, validée et peu onéreuse (Lefebvre et coll., 1996).

### **1.3.4. PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES DE LA CRÉATINE KINASE**

L'analyse pharmacocinétique de la libération de créatine kinase chez la brebis a déjà été étudiée par Houpert et coll. (1995) et Verlinde et coll. (1996). Ils ont utilisé un modèle bicompartimental, décrit par une équation bi-exponentielle du type :

$$C(t) = Y_1 \exp(-\lambda_1 t) + Y_2 \exp(-\lambda_2 t) + C_0$$

Après administration intraveineuse de créatine kinase à 25 brebis (extraite de muscle,  $123 \pm 38$  U/kg), les paramètres usuels ont été déterminés :

|                                |                             |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Volume du compartiment central | $V_c = 45 \pm 5$ ml/kg      |
| Temps de demi-vie              | $t_{1/2} = 3.69 \pm 1.65$ h |
| Clairance plasmatique          | $Cl = 23 \pm 8$ ml / kg/h   |
| Activité basale                | 60 à 172 U/l                |

Les résultats obtenus après une injection intramusculaire de créatine kinase sont présentés dans le tableau 3.

Cette étude pharmacocinétique a permis de montrer deux points importants concernant la pharmacocinétique de la créatine kinase chez la brebis : la biodisponibilité est identique pour des sites d'injection différents, la variabilité inter-individuelle d'estimation des quantités de muscle lésé pour un même produit est modérée.

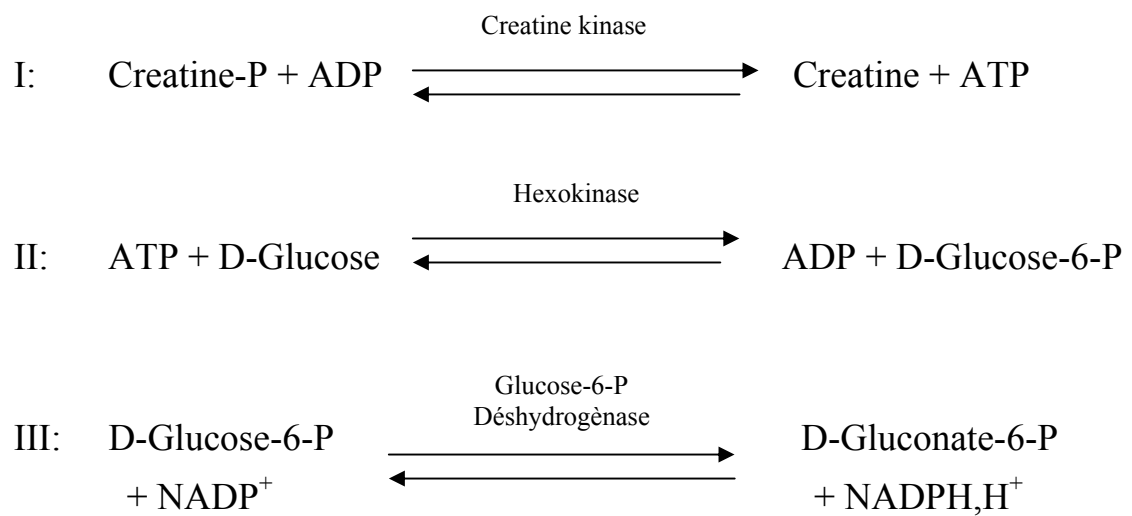


Figure 3 : Principe de la mesure d'activité plasmatique de la créatine kinase préconisé par l'International Federation of Clinical Chemistry. L'hexokinase est l'ATP : D-hexose-6-phosphotransférase, EC 2.7.1.1. La glucose-6-phosphate deshydrogenase est la D-glucose-6-phosphate : NADP+ 1-oxydoreductase, EC 1.1.1.49. La réaction est mesurée par spectrophotométrie à 339 nm à 30°C et la concentration d'activité calculée par cinétique en fonction du coefficient a, exprimé en  $\mu\text{mol} / \text{min.l}$ .

Tableau 2 : Composition du kit Biomérieux n°6.315,1 pour la mesure de l'activité de la créatine kinase. Les numéros des réactions font référence à la figure 3. CK : Créatine Kinase, G6P DH : Glucose-6-Phosphate DésHydrogénase. L'adénylate kinase (myokiase E.C.2.7.4.3; ATP: AMP phosphotransférase) est une enzyme présente dans les cellules musculaires, les plaquettes et les hématies, qui peut perturber la mesure car elle transforme deux molécules d'ATP, cosubstrat de la CK, en ATP + AMP.

| Constituant                | Concentration | Rôle   |
|----------------------------|---------------|--|
| Imidazole acétate          | 100 mmol/l    | Tampon pH=6.6 nécessaire à la réaction I   |
| Acétate Mg                 | 10 mmol/l     | Mg <sup>2+</sup> nécessaire à la réaction I  |
| Créatine phosphate         | 30 mmol/l     | Substrat de la créatine kinase (Réaction I)  |
| ADP                        | 2 mmol/l      | Cosubstrat de la créatine kinase   |
| Hexokinase                 | 50 µkatal/l   | Enzyme de la réaction II   |
| D-glucose                  | 20 mmol/l     | Substrat de l'hexokinase   |
| Glucose-6-P. DH            | 33 µkatal/l   | Enzyme de la réaction III  |
| NADP+                      | 2 mmol/l      | Cosubstrat de la G6P DH  |
| N-acétylcystéine           | 20 mmol/l     | Réducteur protecteur des thiols des résidus cystéine de la créatine kinase   |
| Diadénosine pentaphosphate | 10 µmol/l     | Inhibiteur de l'adénylate kinase   |
| AMP                        | 5 mmol/l      | Déplace la réaction de l'adénylate kinase vers la formation d'ATP  |
| EDTA                       | 2 µmol/l      | Complexé les ions inhibiteurs de la CK : Mn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> . |

Tableau 3 : Biodisponibilité sanguine de la CK administrée par voie intramusculaire et comparaison muscle glutéal / lombaire. (D'après Verlinde et coll. 1996)

| Paramètre                                     | Unités  | Administration |                |                 |
|---|---------|----------------|----------------|-----------------|
|   |         | IV             | IM             |                 |
|   |         |                | Muscle glutéal | Muscle lombaire |
| Dose  | U/kg    | 109            | 324            | 390             |
| Base  | U/l     | 89.4 ± 18.3    | 92.6 ± 35.1    | 98.4 ± 32.0     |
| Demi vie d'élimination ( $T_{1/2\lambda_2}$ ) | h       | 3.69 ± 0.69    | 8.57 ± 5.88    | 7.25 ± 3.98     |
| Concentration maximale (Cmax)                 | U/l     | 2500 ± 226     | 547 ± 188      | 716 ± 266       |
| Temps où C est maximale (Tmax)                | h       | -              | 5.01 ± 1.30    | 4.00 ± 1.68     |
| Aire sous la courbe (AUC)                     | U.h / l | 6908 ± 1849    | 7845 ± 2247    | 10077 ± 2992    |
| Biodisponibilité (F)                          | %       | -              | 41.7 ± 17.9    | 41.5 ± 7.6      |

## **1.4. LA PHENYLBUTAZONE**

### **1.4.1. GENERALITES**

La phénylbutazone est un anti-inflammatoire non stéroïdien vendu sous les noms déposés Phénylarthrite<sup>®</sup> injectable ou crème (A.M.M. pour les équins, bovins, porcins et chiens), Equipalazone<sup>®</sup> (poudre orale pour les chevaux uniquement) et Phenyzone<sup>®</sup> (pâte orale pour chevaux) (Meissonnier et coll. 2001). La formulation Phénylarthrite<sup>®</sup> est très mal tolérée par voie intramusculaire, en raison du pH élevé (8.5) du sel sodique utilisé et les injections doivent être impérativement profondes. C'est en partie pour cette raison qu'elle a déjà été utilisée dans l'étude de tolérance aux injections intramusculaires par Houpert et coll. (1995).

### **1.4.2. PHARMACOCINETIQUE DE LA PHENYLBUTAZONE**

Du fait de sa lipophilie, la phénylbutazone peut être administrée par voie intramusculaire, intraveineuse ou orale.

Le temps de demi-vie de la phénylbutazone est très variable selon les espèces : 3 à 6 heures chez le cheval, 42 à 60 heures chez les bovins, 6 heures chez le chien, 72 heures chez l'homme. Le temps de demi-vie de son principal métabolite, l'oxyphénylbutazone, est beaucoup plus court. Il est d'une heure chez les bovins et le chien.

La phénylbutazone a une très grande affinité pour les protéines plasmatiques et la relation entre le pourcentage de fixation et la concentration plasmatique n'est pas linéaire. Sa distribution est surtout extra-cellulaire et elle s'accumule dans les zones à pH acide, comme les sites inflammatoires par exemple. L'élimination se fait à la fois par la bile et les urines et très faiblement dans le lait. La proportion entre les deux voies principales dépend essentiellement du pH urinaire mais la clairance plasmatique est très peu modifiée car elle est majoritairement hépatique.

## 2. OBJECTIFS

Le but de cette étude est de mettre en évidence le rôle du volume injecté sur la lésion musculaire produite par une injection intra-musculaire. Pour cela on se propose d'injecter des volumes croissants (2, 4 et 8 ml) d'une substance irritante (la phénylbutazone) à des brebis, à différents sites d'injection, dans les muscles des lombes (*Longissimus dorsi*) et de suivre l'activité de la créatine kinase, marqueur intracellulaire musculaire, au cours du temps. Il est alors possible de calculer les aires sous la courbe (AUC) de la concentration d'activité de la créatine kinase en fonction du temps et la concentration d'activité maximale (Cmax). L'objectif étant de montrer une augmentation de l'AUC ou du Cmax suite à l'augmentation du volume injecté et, si possible, trouver une fonction mathématique  $AUC=f(\text{Volume})$  ou  $C_{max}=f(\text{Volume})$ .

Nous étudierons également la pharmacocinétique de la phénylbutazone, en déterminant sa clairance plasmatique, sa biodisponibilité intramusculaire et son AUC et son Cmax, suite aux injections.

## **3. MATERIELS ET METHODES**

### **3.1. PLAN EXPERIMENTAL**

Les brebis ont été réparties par tirage au sort en 3 groupes de deux animaux dans un cross-over à 3 périodes. Chaque brebis a reçu au total 3 administrations intramusculaires avec 3 volumes différents et 3 sites différents d'administration. L'AUC de l'activité de la créatine kinase plasmatique en fonction du temps a été déterminée pour chaque volume administré.

### **3.2. LES ANIMAUX ET LEUR ENTRETIEN**

L'étude a été réalisée sur 6 brebis Lacaune adultes hors lactation et hors gestation, pesant au début de l'étude entre  $76 \pm 9.0$  kg. Elles ont été acclimatées 15 jours dans un box de 3.60 x 3.50 m<sup>2</sup> dans lequel elles étaient hébergées en dehors des cinétiques. Avant chaque étude, elles étaient placées dans des cages à métabolisme (1.24 x 0.46 m<sup>2</sup>), au moins un jour avant. Les animaux recevaient le matin entre 8 h et 9 h une ration de 300 g de granulés du commerce (Aliment 357384 de chez R.A.G.T. Albi) et du foin *ad libitum*. Le jour des cinétiques, la distribution de nourriture était faite avant les administrations. L'abreuvement se faisait par de l'eau de circulation courante *ad libitum*.

Les animaux étaient suivis régulièrement par un vétérinaire pour apprécier leur état de santé. Lors des administrations intramusculaires, le site était inspecté afin de déceler toute anomalie (œdème, rougeur, douleur, abcès) avant, 3 h, 7 h après l'administration, puis tous les jours pendant 5 jours.

Aucun traitement n'a été administré au cours de la phase expérimentale à l'exception du produit test. Une administration d'ivermectine (IVOMECA OVIN<sup>®</sup>, 200 µg/kg, sous-cutanée à l'encolure) a été effectuée chez tous les animaux deux mois avant le début de la première période. Les animaux ont été pesés individuellement au début de la période d'acclimatation, avant chaque cinétique et en fin de phase animale.



### 3.3. LA SUBSTANCE TEST

La substance administrée par voie intra-musculaire était de la phénylbutazone (PHENYLARTHRITE<sup>®</sup> injectable à 0.2 g/ml, lot 6413, date d'expiration 11/99). Les volumes administrés étaient :

Volume 1 : 2 ml

Volume 2 : 4 ml

Volume 3 : 8 ml

Trois sites d'administration ont été choisis dans la région lombaire (M. *longissimus dorsi*) :

Site  $\alpha$  : 7 cm en avant de la ligne qui rejoint les épines iliaques ventro-crânielles et 4 cm latéralement à droite du rachis.

Site  $\beta$  : 19 cm en avant de la ligne qui rejoint les épines iliaques ventro-crânielles et 4 cm latéralement à droite du rachis.

Site  $\gamma$  : 13 cm en avant de la ligne qui rejoint les épines iliaques ventro-crânielles et 4 cm latéralement à gauche du rachis.

Le détail des localisation est présenté sur la figure 4.

Un cross-over a été effectué entre les volumes, les sites d'injection et les animaux. Le schéma de celui-ci est présenté dans le tableau 4.

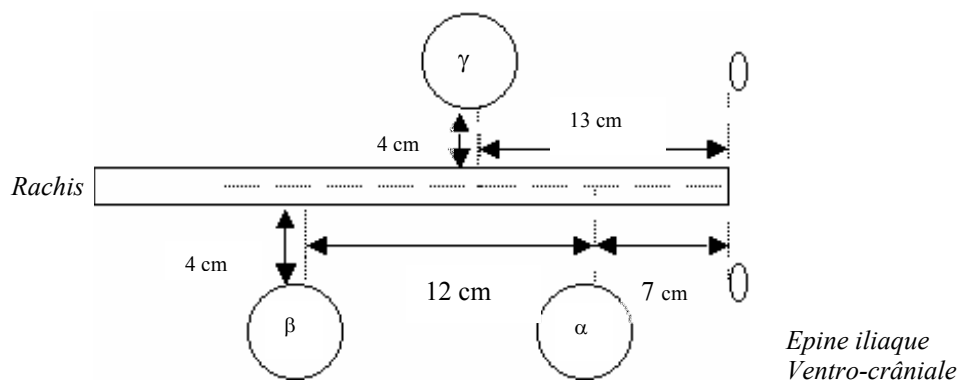


Figure 4 : Localisation anatomique des sites d'injection.

Tableau 4: Plan de cross-over des volumes injectés et des sites d'injection.

| Groupe              | Période 1<br>25/03/97 |          | Période 2<br>25/04/97 |          | Période 3<br>16/05/97 |          |
|---------------------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|
|                     | Volume                | Site     | Volume                | Site     | Volume                | Site     |
| I (Brebis A et B)   | 8                     | $\alpha$ | 4                     | $\beta$  | 2                     | $\gamma$ |
| II (Brebis C et D)  | 4                     | $\gamma$ | 2                     | $\alpha$ | 8                     | $\beta$  |
| III (Brebis E et F) | 2                     | $\beta$  | 8                     | $\gamma$ | 4                     | $\alpha$ |

Les brebis ont été tondues et savonnées à l'Hibiscrub à la fin de la période d'acclimatation et avant chaque cinétique. Le matin de l'administration, la région a été nettoyée avec de l'alcool à 70°.

L'administration a été réalisée avec une aiguille de 1.1x40 mm (Terumo 19G x 1 ½", 40-11, lot 8893F02D) et une seringue adaptée au volume à injecter (seringues Discardit II de chez Becton Dickinson):

Volume 1 : seringue de 2 ml

Volume 2 : seringue de 5 ml

Volume 3 : seringue de 10 ml

La vitesse d'administration a été mesurée avec un chronomètre et était fonction du volume :

Volume 1 : Environ 5 s

Volume 2 : Environ 10 s

Volume 3 : Environ 20 s

Les administrations ont eu lieu le matin entre 8h et 10h.

Une injection intra-veineuse de 8 mg/kg de phénylbutazone a aussi été réalisée, avec la même substance (PHENYLARTHRITE® injectable à 0.2 g/ml), après une période de wash-out de 5 mois. Cette injection a servi à déterminer la biodisponibilité musculaire et la clairance plasmatique de la phénylbutazone. Les doses individuelles reçues par les brebis sont présentées dans le tableau 12 de l'annexe 3.

### **3.4. PRELEVEMENTS**

Un cathéter intraveineux (Longueur : 30 cm, Ø int. : 1.0 mm, Ø ext. : 1.5 mm, Vygon, Ecouen, France) a été mis en place dans la jugulaire droite (tondue auparavant) la veille de la cinétique et fixé à l'aide d'une bande d'élastoplaste sur l'encolure de l'animal. Il était rincé avec une solution d'héparine (20 U/ml, dans du sérum physiologique).

Avant chaque prélèvement, on retirait 1 ml de sang afin de rincer l'espace mort. Après chaque prélèvement, on administrait 2 ml de chlorure de sodium isotonique hépariné. Le cathéter a été retiré après le dernier prélèvement.

Les prélèvements ont été réalisés aux temps suivants :

-60, -30, 0 (juste avant l'administration), 15, 30, 45 et 60 min, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 et 32 h, 2, 3, 4, et 5 jours.

Le volume prélevé était de 4 ml. Le sang était placé immédiatement dans un tube hépariné dans de la glace pilée puis, dans un délai n'excédant pas 30 min, centrifugé (3000 g, 10 min). Trois fractions aliquotes de plasma (environ 0.5 ml) ont été congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au dosage.

Les tubes ont été identifiés par le numéro de la période (1 à 3), la lettre de l'animal (A à F) et le numéro d'ordre du prélèvement (1 à 19).

### **3.5. DOSAGES**

L'activité de la créatine kinase plasmatique a été dosée par une méthode cinétique du commerce (réactif n° 6.315,1 Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) à  $30^{\circ}\text{C}$  selon la procédure recommandée par la SFBC sur automate Cobas Mira+ (Roche, Neuilly-sur-Seine, France). La méthode est décrite plus en détail dans le paragraphe 1.3.2.

La phénylbutazone et l'oxyphénylbutazone, son principal métabolite, ont été dosées par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Brièvement,

le standard interne (nimésulide), la phénylbutazone et l'oxyphénylbutazone ont été extraits du plasma par précipitation à l'acétonitrile. La chaîne CLHP était équipée d'un injecteur automatique, d'un détecteur ultraviolet (254 nm) et d'une pompe isocratique. La séparation a été réalisée sur une colonne en phase inverse (Lichrospher C18, 6 µm, 125 x 4.0 mm) protégée par une colonne de garde. L'éluant était constitué d'un mélange 60 : 40 (v/v) méthanol / acide acétique à 2 %, le débit était de 0.4 ml/min. La courbe de calibration était comprise entre 0.1 et 20 µg/ml.

Répétabilité et reproductibilité étaient inférieures à 15%. La précision variait de 99 à 109% pour la phénylbutazone et de 103 à 110% pour l'oxyphénylbutazone. La limite de quantification était de 0.25 µg/ml pour la phénylbutazone et de 0.2 µg/ml pour l'oxyphénylbutazone.

### **3.6. METHODES PHARMACOCINETIQUES**

Les aires sous la courbe (AUC, pour Area Under the Curve) de la concentration d'activité plasmatique de la créatine kinase en fonction du temps ont été calculées par la méthode des trapèzes (Gibaldi et Perrier, 1982) avec le logiciel Winnonlin 3.0 (Pharsight corp., Mountain View, CA, USA). C<sub>max</sub> et T<sub>max</sub> sont la concentration d'activité maximale observée et le temps où C<sub>max</sub> est atteinte, respectivement.

AUC, C<sub>max</sub> et T<sub>max</sub> ont été déterminés de la même façon pour la phénylbutazone. Une injection IV de phénylbutazone nous permet de calculer par ailleurs la biodisponibilité intramusculaire et la clairance plasmatique moyenne grâce aux formules suivantes :

$$\text{Biodisponibilité } F(\%) = \frac{\text{AUC}_{\text{IM}} \times \text{Dose}_{\text{IV}}}{\text{AUC}_{\text{IV}} \times \text{Dose}_{\text{IM}}} \times 100$$

$$\text{Clairance (l/kg/h)} = \frac{\text{Dose}_{\text{IV}} \text{ (mg/kg)}}{\text{AUC}_{\text{IV}} \text{ (mg.h/l)}}$$

### 3.7. CALCUL DE LA MASSE DE MUSCLE LESE

La masse de muscle détruit peut être calculée par la formule  $M = a \times \text{AUC}$  où  $a$  est un coefficient qui dépend notamment du muscle concerné. Houpert et coll. (1995) le donnent pour les muscles glutéaux et les muscles du cou mais pas pour les muscles lombaires. Elle peut également être calculée par la formule :

$$Q = (\text{Cl} \times \text{AUC}_{\text{CK}}) / (F \times M) \quad (\text{Ferré et coll. 2001})$$

où  $\text{Cl}$  est la clairance plasmatique de la créatine kinase,  $F$  la biodisponibilité à partir du muscle et  $M$  l'activité moyenne dans le muscle. Ferré et coll. ont calculé ces trois valeurs pour le muscle qui nous intéresse, *Longissimus dorsi* :  $\text{Cl} = 0.024 \pm 0.0102$  l/kg/h (Houpert et coll. trouvaient  $0.0168 \pm 0.0072$ ),  $F = 106 \pm 31.7$  % (fixée arbitrairement à 100 % pour les calculs.) et  $M = 2300 \pm 403.9$  U/g.

L'équation  $a = \text{Cl} / (F \times M)$  nous donne donc  $a = 10.4 \times 10^{-6}$  g.l/U/kg/h et on peut donner l'équation suivante :

$$Q = 10.4 \times 10^{-6} \times \text{AUC}_{\text{CK}}$$

### 3.8. METHODES STATISTIQUES

Les effets du volume, de la période, de la séquence et de l'individu dans la séquence sur l'AUC ou le Cmax de la créatine kinase ont été étudiés par une analyse de variance selon le modèle linéaire suivant, à l'aide du logiciel Systat 10.2 (SPSS Inc., Chicago, Ill, USA).

$$Y_{i,j,k,n} = \mu + \text{Volume}_i + \text{Période}_j + \text{Groupe}_k + \text{Animal}_n / \text{Groupe}_k + \varepsilon_{i,j,k,n}$$

$Y_{i,j,k,n}$  est la variable réponse (AUC, Cmax, log AUC ou log Cmax),  $\mu$  est l'effet moyen,  $\text{Volume}_i$  est l'effet du volume  $i$  de phénylbutazone injecté,  $\text{Période}_j$  est l'effet de la période  $j$ ,  $\text{Groupe}_k$  est l'effet du groupe  $k$ ,  $\text{Animal}_n / \text{Groupe}_k$  est l'effet de l'animal  $n$  dans le groupe  $k$ ,  $\varepsilon_{i,j,k,n}$  est la résiduelle du modèle (erreur).

Le risque de première espèce a été fixé à 5%. L'effet du site n'a pas été introduit dans le modèle car on suppose à priori qu'il est nul.

Le coefficient de corrélation entre la dose moyenne injectée et la quantité de muscle lésé a été calculé par simple régression linéaire avec le logiciel Microsoft Excel 2000.

La transformation logarithmique de la variable réponse sert à rendre les variances homogènes, condition nécessaire à l'utilisation du modèle linéaire ci-dessus. Elle a pour effet de « resserrer » les valeurs autour de la moyenne et ainsi de mieux visualiser les effets éventuels. Les variances ne sont pas homogénéisées dans le cas du Cmax et les résultats du tableau 8 pour log(Cmax) ne doivent donc pas être pris en compte. L'effet des transformations logarithmiques sur l'homogénéité des variances est représenté sur les figures 50 et 51 de l'annexe 10.

## 4. RESULTATS

### 4.1. PROFIL PLASMATIQUE DE LA CREATINE KINASE

La valeur de créatine kinase basale, qui est la moyenne des trois prises de sang réalisées avant l'injection, aux temps -60, -30 et 0 min a été soustraite des valeurs observées. Elle était pour les volumes 2, 4 et 8 ml respectivement de  $80 \pm 35$ ,  $224 \pm 193$  et  $301 \pm 512$  U/l .

Les résultats du calcul de l'aire sous la courbe (AUC), de la concentration maximale (Cmax) et du temps correspondant à la concentration maximale (Tmax) pour les trois volumes de phénylbutazone injectés figurent dans le tableau 5.

Les tableaux des valeurs individuelles de créatine kinase plasmatique en fonction du volume injecté sont présentés dans l'annexe 8.1 et les courbes de concentration d'activité de la créatine kinase en fonction du temps pour chaque brebis dans l'annexe 8.2.

### 4.2. CINETIQUE PLASMATIQUE DE LA PHENYL BUTAZONE

Les volumes de 2, 4 et 8 ml de phénylbutazone injectés correspondaient à des doses de  $5.2 \pm 0.53$ ,  $10.5 \pm 1.11$  et  $21.3 \pm 2.44$  mg/kg.

Les paramètres pharmacocinétiques AUC, Cmax et Tmax de la phénylbutazone suite à l'injection intramusculaire de trois volumes de phénylbutazone figurent dans le tableau 6.

La dose intraveineuse de phénylbutazone a été de  $8.03 \pm 0.08$  mg/kg. L'AUC moyenne de la phénylbutazone a été de  $117614 \pm 22654$  µg.min/ml, la clairance moyenne de la phénylbutazone est de  $0.0707 \pm 0.0156$  ml/min/kg, l'AUC moyenne de l'oxyphénylbutazone est de  $4762 \pm 856.95$  µg.min/ml, soit  $4.1 \pm 0.67$  % de l'AUC de la phénylbutazone (3.4 à 5 %).



Tableau 5 : Valeurs, par brebis et par volume injecté, de l'AUC (U.min/l), de Cmax (U/ml) et de Tmax (min) de la créatine kinase observés après administration intramusculaire de trois volumes (2, 4 et 8 ml) d'une solution de phénylbutazone.

| Brebis          |      | Volume de phénylbutazone injecté |        |        |
|-----------------|------|----------------------------------|--------|--------|
|                 |      | 2 ml                             | 4 ml   | 8 ml   |
| A               | AUC  | 139                              | 3416   | 1492   |
|                 | Cmax | 86                               | 1686   | 3587   |
|                 | Tmax | 722                              | 236    | 251    |
| B               | AUC  | 185                              | 75     | 340    |
|                 | Cmax | 88                               | 362    | 335    |
|                 | Tmax | 722                              | 132    | 363    |
| C               | AUC  | 446                              | 1008   | 2379   |
|                 | Cmax | 190                              | 1089   | 1240   |
|                 | Tmax | 722                              | 120    | 240    |
| D               | AUC  | 697                              | 1363   | 2574   |
|                 | Cmax | 492                              | 1867   | 1258   |
|                 | Tmax | 480                              | 251    | 360    |
| E               | AUC  | 2421                             | 3559   | 13638  |
|                 | Cmax | 1642                             | 1946   | 5847   |
|                 | Tmax | 363                              | 240    | 1443   |
| F               | AUC  | 1008                             | 968    | 3915   |
|                 | Cmax | 700                              | 572    | 3893   |
|                 | Tmax | 480                              | 482    | 480    |
| Moyenne         | AUC  | 816                              | 1731   | 4056   |
|                 | Cmax | 533                              | 1254   | 2693   |
|                 | Tmax | 592                              | 244    | 523    |
| Ecart-Type (SD) | AUC  | 851,1                            | 1425,9 | 4842,0 |
|                 | Cmax | 595,8                            | 682,5  | 2093,7 |
|                 | Tmax | 159,7                            | 130,2  | 459,2  |

Tableau 6 : Valeurs, par brebis et par volume injecté, de l'aire sous la courbe AUC (U.min/l), de la concentration maximale Cmax (U/ml), du temps correspondant à la concentration maximale Tmax (min) et de la biodisponibilité intramusculaire F(%) de la phénylbutazone observés après administration intramusculaire de trois volumes (2, 4 et 8 ml) d'une solution de phénylbutazone.

| Brebis          |      | Volume de phénylbutazone injecté |        |        |
|-----------------|------|----------------------------------|--------|--------|
|                 |      | 2 ml                             | 4 ml   | 8 ml   |
| A               | AUC  | 86762                            | 148717 | 317030 |
|                 | Cmax | 47.08                            | 70.49  | 118.9  |
|                 | Tmax | 361                              | 120    | 251    |
|                 | F    | 92                               | 74     | 86     |
| B               | AUC  | 111556                           | 175655 | 385452 |
|                 | Cmax | 42.28                            | 83.35  | 148.65 |
|                 | Tmax | 484                              | 132    | 601    |
|                 | F    | 151                              | 117    | 125    |
| C               | AUC  | 53201                            | 137998 | 302398 |
|                 | Cmax | 37.05                            | 83.94  | 131.7  |
|                 | Tmax | 241                              | 60     | 361    |
|                 | F    | 62                               | 78     | 83     |
| D               | AUC  | 52938                            | 136143 | 302266 |
|                 | Cmax | 42.81                            | 67.24  | 109.04 |
|                 | Tmax | 60                               | 121    | 360    |
|                 | F    | 80                               | 105    | 114    |
| E               | AUC  | 74422                            | 135650 | 257953 |
|                 | Cmax | 44.55                            | 77.58  | 100.22 |
|                 | Tmax | 120                              | 60     | 480    |
|                 | F    | 124                              | 115    | 104    |
| F               | AUC  | 64798                            | 128890 | 250878 |
|                 | Cmax | 40.68                            | 62.62  | 105.86 |
|                 | Tmax | 121                              | 360    | 240    |
|                 | F    | 91                               | 89     | 85     |
| Moyenne         | AUC  | 73946                            | 143842 | 302663 |
|                 | Cmax | 42,4                             | 74,2   | 119,1  |
|                 | Tmax | 231                              | 142    | 382    |
|                 | F    | 100                              | 96     | 100    |
| Ecart-Type (SD) | AUC  | 22514                            | 16852  | 48459  |
|                 | Cmax | 3.41                             | 8.79   | 18.25  |
|                 | Tmax | 164.1                            | 111.4  | 138.4  |
|                 | F    | 32.1                             | 18.7   | 17.6   |

Les valeurs individuelles des concentrations plasmatiques en phénylbutazone et oxyphénylbutazone après injection intramusculaire ou intraveineuse de phénylbutazone sont présentées dans l'annexe 8.4 et les courbes correspondantes en fonction du temps dans l'annexe 8.5.

### **4.3. PHARMACOCINETIQUE DE L'OXYPHENYLBUTAZONE**

Comme nous ne disposons pas d'oxyphénylbutazone injectable, qui est nécessaire au calcul des paramètres pharmacocinétiques, les seules données dont nous disposons sont les proportions d'AUC obtenues par rapport aux AUC de la phénylbutazone, après injection IV de phénylbutazone. Ces résultats sont présentés dans le tableau 7.

### **4.4. ETUDE DE L'EFFET VOLUME SUR LES VALEURS DES AUC ET DU CMAX**

Les résultats de calcul de l'influence des facteurs volume, individu, période et groupe sur l'AUC et le Cmax de la créatine kinase sont présentés dans le tableau 8. On considère que l'effet du facteur étudié est significatif si  $P \leq 0.05$ .

### **4.5. QUANTIFICATION DES LESIONS MUSCULAIRES**

La quantité de muscle lésé par kg de poids vif est donnée dans le tableau 9 et illustrée sur la figure 9.

Tableau 7 : Comparaison des AUC de phénylbutazone et de son principal métabolite, l'oxyphénylbutazone, après injection intraveineuse de phénylbutazone à 8 mg/kg, chez les six brebis.

| Brebis  | AUC Phénylbutazone                     | AUC oxyphénylbutazone                  | % AUC                              |
|---------|--|--|------------------------------------|
|         | $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ | $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ | oxyphénylbutazone / phénylbutazone |
| A       | 148171                                 | 5639                                   | 3,8                                |
| B       | 109984                                 | 4030                                   | 3,7                                |
| C       | 129375                                 | 5071                                   | 3,9                                |
| D       | 119688                                 | 5822                                   | 4,9                                |
| E       | 79794                                  | 4014                                   | 5,0                                |
| F       | 118674                                 | 3995                                   | 3,4                                |
| Moyenne | $117614 \pm 22654,1$                   | $4762 \pm 857,0$                       | $4,1 \pm 0,67$                     |

Tableau 8 : Valeurs de P de l'effet des facteurs volume, individu, période et séquence sur l'AUC, le Cmax, le logarithme de l'AUC et le logarithme du Cmax de la créatine kinase.

(\*):  $P \leq 0.05$ , (\*\*):  $P \leq 0.01$  et (\*\*\*) :  $P \leq 0.001$

|                | Créatine Kinase |                |                |                  |
|----------------|-----------------|----------------|----------------|------------------|
|                | AUC             | LOG AUC        | CMAX           | LOG CMAX         |
| Période        | 0,172           | 0,744          | 0,138          | <b>0,040 *</b>   |
| Groupe         | 0,327           | 0,206          | 0,310          | 0,244            |
| Volume         | 0,077           | <b>0,027 *</b> | <b>0,011 *</b> | <b>0,001 ***</b> |
| Brebis(Groupe) | 0,134           | 0,066          | 0,125          | <b>0,037 *</b>   |

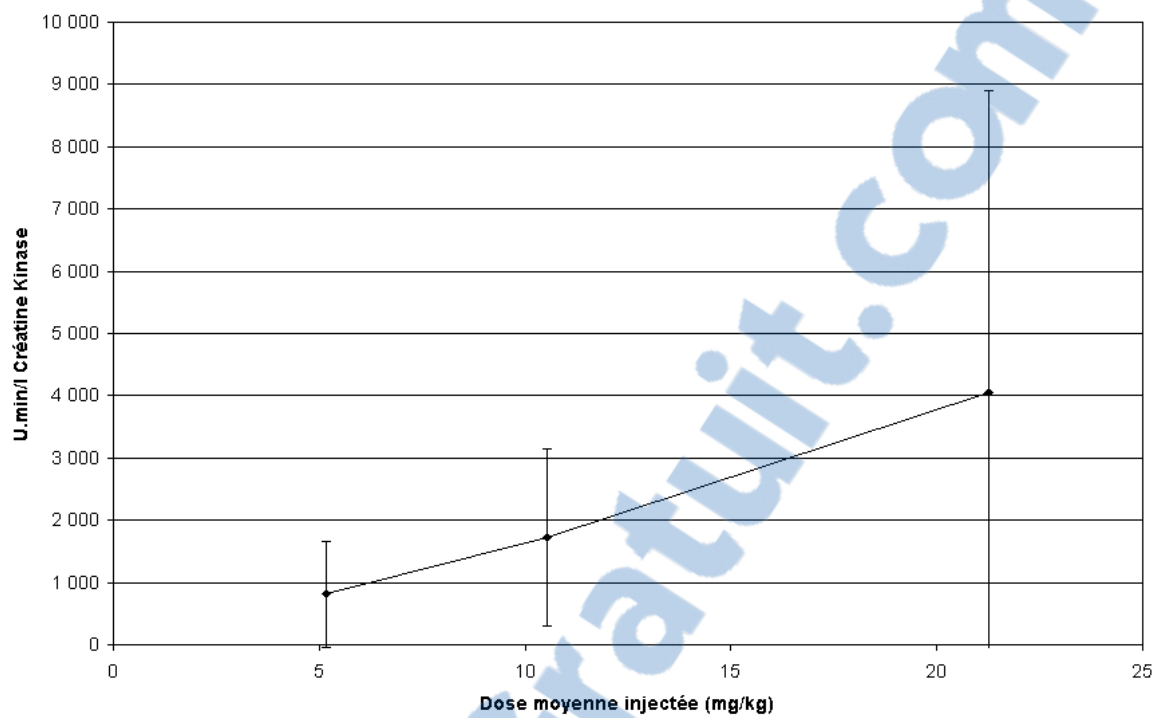


Figure 5 : Influence de la dose moyenne de phénylbutazone injectée dans le muscle sur l'AUC de la créatine kinase.

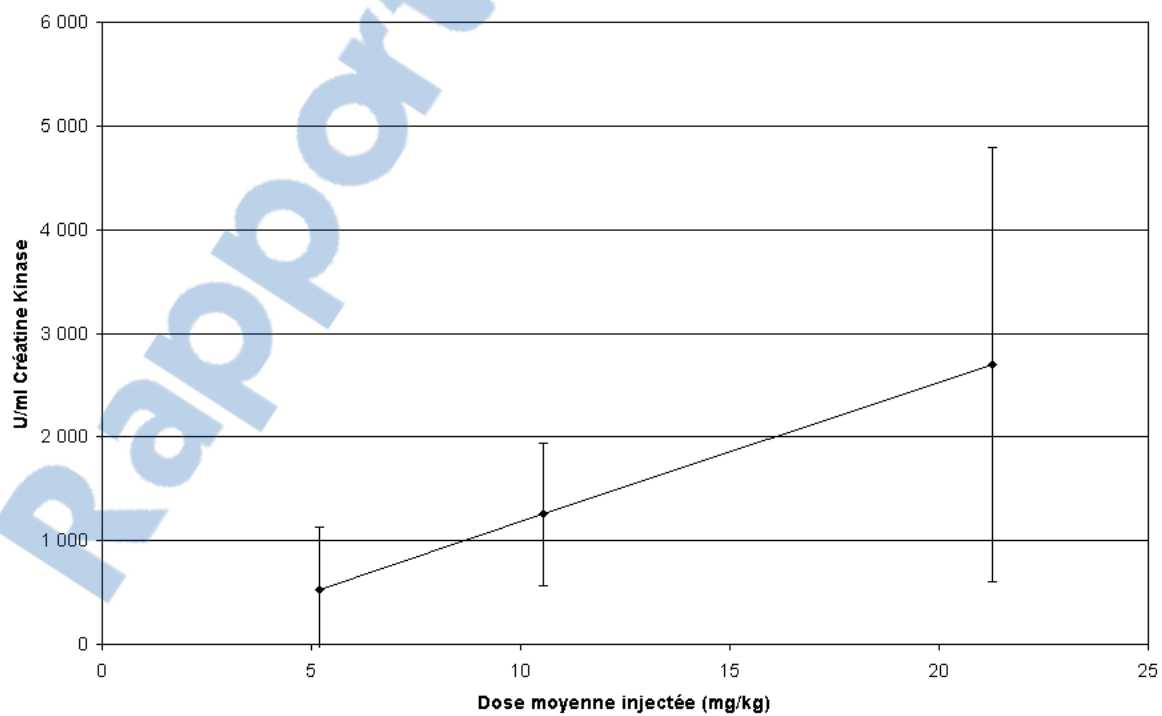


Figure 6 : Influence la dose moyenne de phénylbutazone injectée dans le muscle sur le Cmax de la créatine kinase.

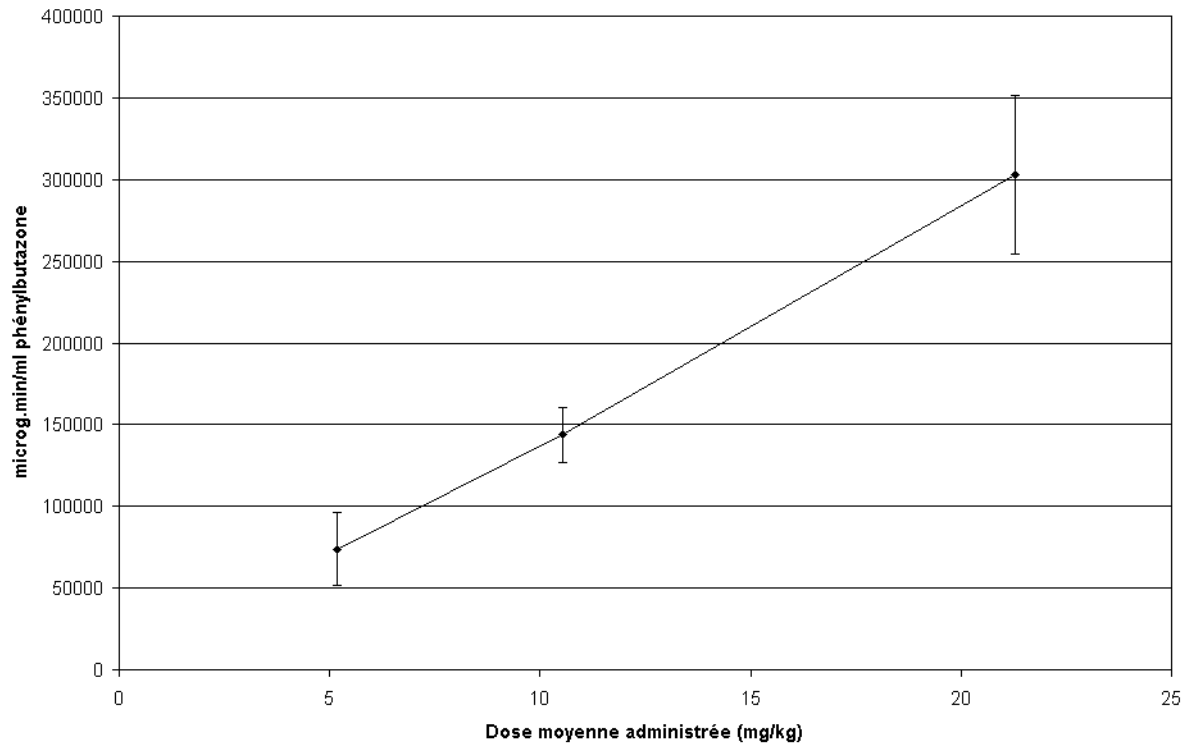


Figure 7 : Influence de la dose moyenne de phénylbutazone injectée dans le muscle sur l'AUC de la phénylbutazone.

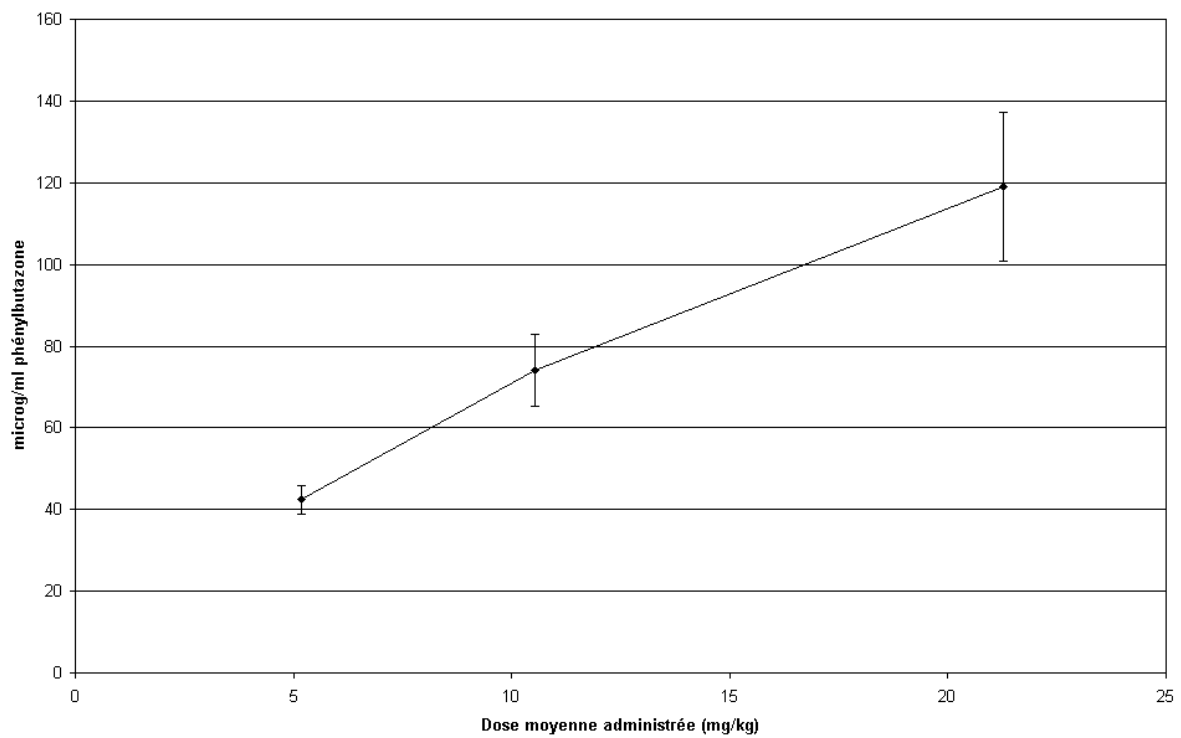


Figure 8 : Influence de la dose moyenne de phénylbutazone injectée dans le muscle sur Cmax de la phénylbutazone.

Tableau 9 : Quantité de muscle lésé exprimée en g par kg de poids vif, pour chaque volume moyen injecté et pour chaque individu et quantités moyennes.

| Volume | Brebis | AUC (U.h/l) | Q (g/kg) | Moyenne $\pm$ SD (g/kg) |
|--------|--------|-------------|----------|-------------------------|
| 2      | A      | 8340        | 0,087    | 0,511 $\pm$ 0.5328      |
|        | B      | 11100       | 0,116    |                         |
|        | C      | 26760       | 0,279    |                         |
|        | D      | 41820       | 0,436    |                         |
|        | E      | 145260      | 1,516    |                         |
|        | F      | 60480       | 0,631    |                         |
| 4      | A      | 204960      | 2,139    | 1,084 $\pm$ 0.8926      |
|        | B      | 4500        | 0,047    |                         |
|        | C      | 60480       | 0,631    |                         |
|        | D      | 81780       | 0,853    |                         |
|        | E      | 213540      | 2,228    |                         |
|        | F      | 58080       | 0,606    |                         |
| 8      | A      | 89520       | 0,934    | 2,540 $\pm$ 3.0315      |
|        | B      | 20400       | 0,213    |                         |
|        | C      | 142740      | 1,489    |                         |
|        | D      | 154440      | 1,612    |                         |
|        | E      | 818280      | 8,539    |                         |
|        | F      | 234900      | 2,451    |                         |

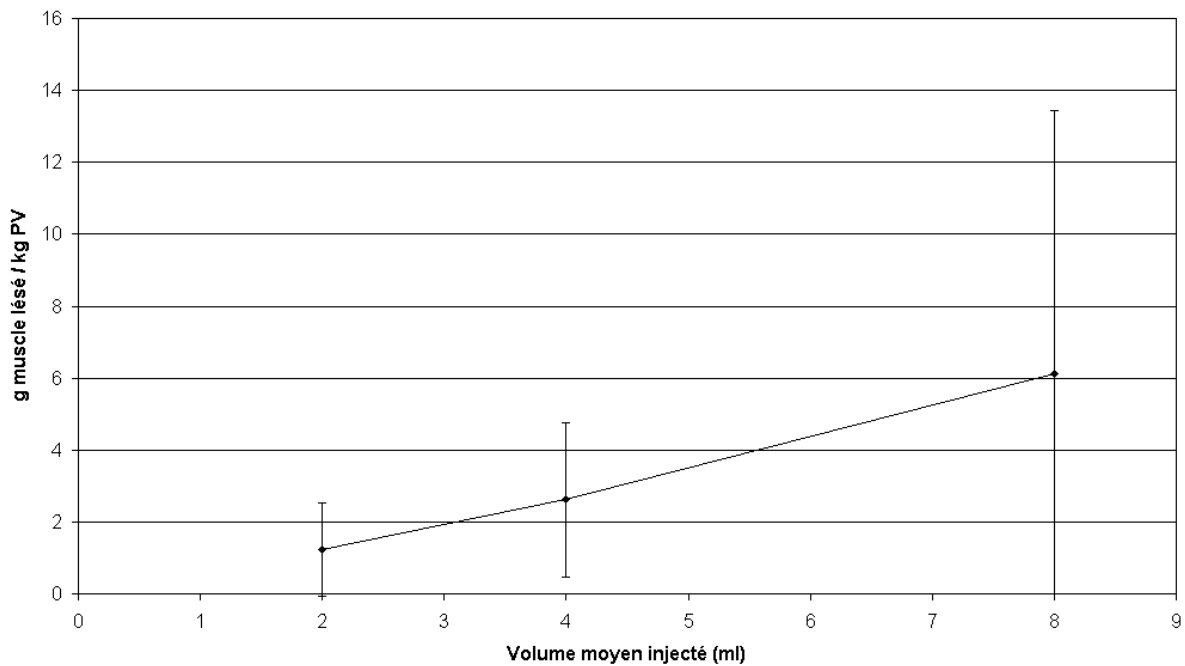


Figure 9 : Relation entre la quantité moyenne de muscle lésé par kg de poids vif et le volume moyen de phénylbutazone injecté, à une concentration de 8 mg/kg.

## 5. DISCUSSION

Notre choix d'espèce s'est porté sur le mouton pour plusieurs raisons. C'est une espèce cible pour les injections intramusculaires ; il est facile à manipuler ; le volume sanguin prélevable n'est pas un facteur limitant pour les études cinétiques et enfin l'activité basale de la créatine kinase plasmatique est constante dans le temps, contrairement au lapin ou au porc par exemple, chez qui elle est grandement modifiée par divers paramètres comme l'état de stress, qui provoque une augmentation de l'activité musculaire qui peut suffire à rehausser la ligne de base (Lefebvre, 1994). Nous avons pris soin de manipuler le moins possible les brebis, qui sont facilement stressables lorsqu'elles sont en cages individuelles car ce sont des animaux à comportement grégaire qui ne supportent pas l'isolement. Cependant ce phénomène peut expliquer en partie les importantes variations de la valeur basale que l'on observe chez un même individu pour les trois périodes.

Le choix du muscle *Longissimus* dorsi a également été motivé par divers avantages. Le risque de pratiquer des injections intermusculaires est réduit par rapport aux muscles du cou qui contiennent de nombreuses aponévroses et des muscles de faible épaisseur. L'anatomie de ces muscles permet une localisation précise des lieux d'injection et rend possible la multiplication des tests sur le même animal. Nous avons ainsi pu réaliser un cross-over à trois périodes, avec trois sites identiques par leur morphologie mais de localisation différente car des injections répétées au même endroit sont néfastes et provoquent des lésions supérieures à la somme des lésions que l'on obtiendrait séparément (Shintani et coll., 1967). De plus, il ne semble pas y avoir de différence entre les muscles droits et gauches. Leur homogénéité et la possibilité de réaliser des injections anatomiquement similaires en des endroits différents nous permettra ainsi de s'affranchir de l'effet site lors des calculs. Enfin l'examen anatomopathologique est également simplifié puisque toutes les coupes présentent une configuration identique. Nous avons donc choisi les muscles lombaires pour ces raisons en dépit du fait qu'ils ne sont pas utilisés dans la pratique vétérinaire.



Il est intéressant de noter que, pour les trois volumes étudiés, la biodisponibilité de la phénylbutazone à partir du muscle *Longissimus dorsi* est pratiquement de 100 %, ce qui montre que cette voie musculaire est quasiment équivalente à une injection IV en matière de biodisponibilité (il n'y a pas de perte de produit qui resterait dans le muscle) mais le délai pour observer le pic plasmatique varie de 142 min (Tmax) pour 4 ml à 382 min pour 8 ml (Voir tableau 7).

La quantité moyenne de muscle lésé semble proportionnelle à la dose administrée, avec un coefficient de corrélation de 0.9897. Cependant il faut rester réservé sur ces conclusions car les écarts-type sont beaucoup trop importants. L'étude de l'effet du volume d'injection sur l'AUC de la créatine kinase par le modèle linéaire donné dans le paragraphe 3.8 donne un résultat non significatif ( $P = 0.077$ ). Par contre le volume a un effet significatif sur le logarithme de l'AUC ( $P = 0.027$ ) et un effet encore plus significatif sur le Cmax ( $P = 0.011$ ). L'absence d'effet du volume sur l'AUC vient sûrement de l'importante variabilité observée et du nombre limité de sujets. Cela indiquerait que la lésion peut largement varier d'un individu à un autre suite à l'administration IM d'un même volume d'une même solution. Cette variabilité importante se retrouve dans la littérature. Par exemple, Houpert et coll. (1995) ont réalisé une injection intramusculaire de phénylbutazone à la même concentration et sur le même nombre de brebis selon un schéma identique. Ils ont obtenu une AUC de  $471 \pm 198$  mg.min/l.

Les variations de réponse intraindividuelles doivent aussi être prises en compte même si elles sont inférieures à 40% (Verlinde et coll., 1996). L'AUC ne présente pas de variations intraindividuelles importante; elle est identique pour un même produit chez un même individu (Ferré et coll., 2001). L'effet individu n'est pas significatif ( $P = 0.066$  pour l'effet sur log AUC et  $P = 0.125$  pour l'effet sur Cmax).

Un des facteurs pouvant expliquer les variations observées est la valeur de base de la créatine kinase plasmatique. En effet les AUC sont calculées après soustraction de la valeur de base. Or celle-ci présente une grande variabilité intraindividuelle, comme le montrent les tableaux 10a, 10b et 10c. Cela modifie grandement les valeurs d'AUC obtenues. C'est un obstacle majeur à l'élaboration d'une méthode d'évaluation des lésions musculaires car de cette valeur dépend l'AUC obtenue et donc l'analyse pharmacocinétique de la créatine kinase, indispensable à toute modélisation.

La biodisponibilité de la créatine kinase après une injection intramusculaire n'a pas été déterminée dans notre étude, mais prise dans la littérature. Or elle apparaît très variable selon les auteurs : Ferré et coll. (2001) ont trouvé une biodisponibilité  $F = 106 \pm 31.7 \%$  (valeur prise pour nos calculs) alors que Verlinde et coll. (1996) ont trouvé  $F = 42 \pm 7.6 \%$ . Cette différence peut provenir d'une différence dans les méthodes de mesure d'activité, ou d'une variation intraspécifique. Les calculs de biodisponibilité devraient donc être réalisés avant chaque étude et pour chaque animal, afin de les calibrer et d'éviter ainsi les variations interindividuelles. La biodisponibilité est en effet un paramètre indispensable à la quantification du muscle lésé. Le seul moyen de la connaître de façon certaine serait de disposer d'une créatine kinase injectable marquée, que l'on pourrait différencier de la créatine kinase endogène libérée par la lésion. En l'absence de ce paramètre, toute quantification est impossible ; il est seulement possible de comparer la tolérance de formulations différentes d'un même principe actif chez un même individu. En effet une quantité de muscle lésé identique peut donner des AUC différentes, en fonction de la clairance, qui est calculée suite à l'IV. La quantité de muscle lésé ne peut être calculée avec précision que si l'on connaît la clairance plasmatique de l'animal qui a reçu l'injection, ce qui alourdirait considérablement les protocoles d'étude.

D'importantes variations se rencontrent également sur la concentration d'activité enzymatique du muscle lombaire. Ferré et coll. (2001) trouvent une concentration de  $2300 \pm 403.9$  U/g (valeur utilisée dans nos calculs) alors que Verlinde et coll. (1996) trouvent  $4448 \pm 160$  U/g.

Par contre la clairance plasmatique de la créatine kinase apparaît homogène :  $24 \pm 10.2$  ml/kg/h pour Ferré et coll. et  $24 \pm 6$  ml/kg/h pour Verlinde et coll.

L'AUC augmente avec le volume injecté, même si ce n'est pas une relation de stricte proportionnalité. Comme l'AUC est représentative des lésions musculaires, nous pouvons affirmer que la lésion augmente avec le volume injecté. Mais le Cmax semble un meilleur indicateur des lésions musculaires que l'AUC. Cependant nous disposons de peu de sujets et les grandes variations observées sur ceux-ci ne permettent pas de donner des résultats statistiquement fiables. Il serait utile de recommencer cette expérience avec un plus grand nombre d'individus pour pouvoir confirmer ou infirmer les effets du volume.

## CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer un effet du volume d'injection sur la lésion induite au point d'injection, à travers le logarithme de l'AUC ou la concentration maximale d'activité plasmatique.

Cependant le nombre limité d'individus dont nous disposions ne permet pas d'affirmer de façon certaine l'existence de cet effet en raison de l'importante variabilité observée. Les tests statistiques réalisés sont d'une puissance très faible (probabilité d'accepter sans se tromper, au risque  $\alpha = 5\%$ , le fait qu'un facteur a une influence significative). Il serait nécessaire de reconduire cette expérimentation avec un nombre de sujets plus importants, afin de limiter les variations inter-individuelles et d'augmenter la puissance des tests.

## BIBLIOGRAPHIE

Astier-Théfenne H., Prévosto J.M., Renard C., Cheminel V., Chaulet J.F., Monnier G. – L'infarctus du myocarde. – Lyon Pharmaceutique 2001, 52, 108-136.

Blom L., Rasmussen F. – Tissue damage at the injection site after intramuscular injection of drugs in hens. – Br. Poult. Sci., 1976, 17, 1-4.

Brazeau G.A., Fung H.L. – Use of an in vitro model for the assessment of muscle damage from intramuscular injections : in vitro – in vivo correlation and predictability with mixed solvent systems. – Pharm. Res., 1989, 6, 766-771.

Cioc M., Von Schilling B. – Changes in muscular tissue produced by injection of some known drugs. – Toxicol. Appl. Pharmacol., 1965, 7, 179-189.

Dickson J., Hopkins D.L., Doncon G.H. – Muscle damage associated with injections of vitamin E in sheep. – Austr. Vet. J., 1986, 63, 231-233.

Fayolle P., Lefebvre H.P., Braun J.P. – Effect of incorrect venepuncture on plasma creatine kinase activity in dog and horse. – Brit. Vet. J., 1992, 148, 161-162.

Ferré P.J., Concordet D., Laroute V., Chanoit G.P., Ferré J.P., Manesse M., Lefebvre H.P. – Comparison of ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase release for quantitative assessment of postinjection muscle damage in sheep. – Am. J. Vet. Res., 2001, 62, 11, 1698-1705.

Gibaldi M., Perrier D. – Pharmacokinetics, 2ième édition – Editions Marcel Dekker, New York, 1982.

Greenblatt D.J., Allen M.D.- Intramuscular injection-site complications. – J. Am. Med. Assoc., 1978, 240, 542-544.

Hørder M., Elser R.C., Gerhardt W., Mathieu M, Sampson E.J. – Approved recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7: IFCC method for creatine kinase (ATP : Creatine N-Phosphotransferase, EC 2.7.3.2). – Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1991, 29, 435-456.

Houpert P., Serthelon J.P., Lefebvre H.P., Toutain P.L., Braun J.P. - In vivo non-invasive quantification of muscle damage following a single intramuscular injection of phenylbutazone in sheep. - Veterinary and Human Toxicology, 1995, 37, 105-110.

Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. – Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 5ième édition, 1997, Academic Press.

Labbe R., Lindsay T., Gatley R., Romaschin A., Mickle D., Wilson G., Houle S., Walker P. – Quantitation of postischemic skeletal muscle necrosis : histochemical and radioisotope techniques. – J. Surg. Res., 1988, 44, 45-53.

Ladage C.A., Van Walstijn T.A., Van Riessen H.A. – Comparative macroscopic evaluation of muscle damage in rats and in cattle after intramuscular administration of some commercially available injectable medicines. - Trends in veterinary pharmacology and toxicology. Proceedings of the first european congress of veterinary pharmacology and toxicology Zeist., 28-29 September 1979, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 34-40.

Lefebvre H.P. - Evaluation quantitative des lésions musculaires iatrogènes par l'analyse pharmacocinétique de la libération de la créatine kinase. - Thèse, Institut National Polytechnique, Toulouse, 1994.

Lefebvre H.P., Laroute V., Braun J.P., Lassourd V., Toutain P.L. – Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatine kinase release. – *Vet. Res.*, 1996, 27, 343-361.

Lehninger, Nelson, Cox – *Principes de Biochimie*, 2<sup>ième</sup> édition, 1994, Medecine Sciences Flammarion.

Löw O., Machnik G., Simon G., Schiketanz H. – Versuche zur quantitativen Erfassung der lokalen Gewebsschädigungen nach intramusculärer injektion wäßriger Lösungen. II. Der Einfluß von Versuchsdauer, Konzentration und Injektionsvolumen auf das Schädigungsausmaß. – *Zbl. Pharm.*, 1971, 110, 925-930.

Meissonnier E., Devisme P., Join-Lambert P. – *Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires et des Produits de Santé Animale*. – Editions du Point Vétérinaire, 2001, Paris, France.

Mevius D.J., Nouws J.F.M., Breukink H.J., Vree T.B., Driessens F., Verkaik R. – Comparative pharmacokinetics, bioavailability and renal clearance of five parenteral oxytetracycline-20% formulations in dairy cows. – *Vet. Quart.*, 1986, 8, 285-294.

Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. – *Précis de biochimie de Harper*, 8<sup>ième</sup> édition, 1995, De Boeck Université, France.

Nouws J.F.M. – Irritation, bioavailability, and residue aspects of ten oxytetracycline formulations administered intramuscularly to pigs. – *Vet. Quart.*, 1984, 6, 80-84.

Nouws J.F.M., Smulders A., Rappalini M. – A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep. – *Vet. Quart.*, 1990, 12, 129-138.

Nouws J.F.M., Vree T.B. – Effect of injection site on the bioavailability of an oxytetracycline formulation in ruminant calves. – *Vet. Quart.*, 1983, 5, 165-170.

Payrière M., Lefebvre H.P., Braun J.P. – Effets du délai avant centrifugation et de l'hémolyse sur l'activité de la créatine kinase plasmatique chez le cheval et le chien, note technique.- *Rev. Méd. Vét.*, 1991, 142, 749-751.

Rasmussen F. – Tissue damage at the injection site after intramuscular injection of drugs. – *Vet. Sci. Comm.*, 1978, 2, 173-182.

Rasmussen P., Svendsen O. – Tissue damage and concentration at the injection site after intramuscular injection of chemotherapeutics and vehicles in pigs. – *Res. Vet. Sci.*, 1976, 20, 55-60.

Shintani S., Yamazaki M., Nakamura M., Nakayama I. – A new method to determine the irritation of drugs after intramuscular injections in rabbits. – *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1967, 11, 293-301.

Sidell F.R., Culver D.L., Kaminskis A. – Serum creatine phosphokinase activity after intramuscular injection. The effect of dose, concentration and volume. – *J. Am. Med. Assoc.*, 1974, 229, 1894-1897.

Steiness E., Rasmussen F., Svendsen O., Nielsen P. – A comparative study of serum creatine phosphokinase (CPK) activity in rabbits, pigs and humans after intramuscular injection of local damaging drugs. – *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1978, 42, 357-364.

Steiness E., Svendsen O., Rasmussen F. – Plasma digoxin after parenteral administration. Local reaction after intramuscular injection. – *Clin. Pharmacol. Therap.*, 1974, 16, 430-434.

Steiness E., Svendsen O., Rasmussen F., Nielsen P. – Prediction of local damage after intramuscular injection. In: « Drug design and adverse reactions ». – Alfred Benzon Symposium X, Munksgaard, 1977, 110-117.



Svendsen O., Blom L.- Intramuscular injections and muscle damage: effects of concentration, volume, injection speed and vehicle. - Arch. Toxicol., 1984, Suppl. 7, 472-475.

Verlinde V., Mikaelian I., Laurentie M., Sanders P., Poul JM. – Biodisponibilité de la créatine kinase musculaire chez le mouton. Application à l'évaluation de la tolérance locale de formulations vétérinaires injectables. – Vet. Res., 1996, 27, 133-146.

Wallimann T., Wyss M., Brdiczka D., Nicolay K., Eppenberger H.M.- Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. - Biochem. J., 1992, 281, 21-40.

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Page

- 11 Tableau 1 : Index d'irritation tissulaire au site d'injection (traduit de Nouws. et coll. 1990)
- 20 Tableau 2 : Composition du kit Biomérieux de mesure d'activité de la créatine kinase.
- 21 Tableau 3 : Biodisponibilité sanguine de la CK administrée par voie intramusculaire et comparaison muscle glutéal / lombaire. (D'après Verlinde et coll. 1996)
- 26 Tableau 4: Plan de cross-over des volumes injectés et des sites d'injection.
- 33 Tableau 5 : Paramètres pharmacocinétiques de la CK après injection IM de phénylbutazone.
- 34 Tableau 6 : Paramètres pharmacocinétiques de la phénylbutazone après injection IM de phénylbutazone.
- 36 Tableau 7 : Comparaison des AUC de phénylbutazone et d'oxyphénylbutazone.
- 36 Tableau 8 Valeurs de P de l'effet des facteurs volume, individu, période et séquence sur l'AUC, le Cmax, le logarithme de l'AUC et le logarithme du Cmax de la créatine kinase.
- 39 Tableau 9 : Quantité de muscle lésé pour chaque volume et chaque brebis.
- 53 Tableau 10a : Valeurs de CK et Différence CK – Base (B) pour les brebis A et B
- 54 Tableau 10b et c : Valeurs de CK et Différence CK – Base (B) pour les brebis C,D et E,F
- 61 Tableau 11 : Doses individuelles de phénylbutazone reçues après injection IM de phénylbutazone.
- 61 Tableau 12 : Doses individuelles de phénylbutazone reçues après injection IV de phénylbutazone.
- 62 Tab. 13a : Concentration plasmatique de phénylbutazone ( $\mu\text{g/ml}$ ) en fonction du volume injecté, pour les brebis A à C.
- 62 Tab. 13b : Concentration plasmatique de phénylbutazone ( $\mu\text{g/ml}$ ) en fonction du volume injecté, pour les brebis D à F.
- 69 Tableau 14a et b: Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du volume de phénylbutazone injecté.
- 76 Tableau 15 : Valeurs des concentrations plasmatiques de phénylbutazone et oxyphenbutazone après injection IV de phénylbutazone, pour les six brebis.
- 
- 15 Figure 1 : Réaction de Lohman
- 16 Figure 2 : Schéma de synthèse du métabolisme énergétique du muscle squelettique (D'après Lehninger et coll. 1994)
- 19 Figure 3 : Principe de la mesure d'activité plasmatique de la créatine kinase préconisé par l'IFCC
- 26 Figure 4 : Localisation anatomique des sites d'injection.
- 37 Figure 5 : Influence de la dose moyenne de phénylbutazone injectée dans le muscle sur l'AUC de la créatine kinase
- 37 Figure 6 : Influence de la dose moyenne de phénylbutazone injectée dans le muscle sur Cmax de la créatine kinase
- 38 Figure 7 : Influence de la dose moyenne de phénylbutazone injectée dans le muscle sur l'AUC de la phénylbutazone
- 38 Figure 8 : Influence de la dose moyenne de phénylbutazone injectée dans le muscle sur Cmax de la phénylbutazone
- 39 Figure 9 : Relation entre la quantité de muscle lésé et le volume moyen de phénylbutazone injecté.
- 55 Figure 10 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis A
- 55 Figure 11 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis B



- 72 Figure 39 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis F
- 73 Figure 40 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis A (échelle semi-logarithmique)
- 73 Figure 41 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis B (échelle semi-logarithmique)
- 74 Figure 42 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis C (échelle semi-logarithmique)
- 74 Figure 43 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis D (échelle semi-logarithmique)
- 75 Figure 44 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis E (échelle semi-logarithmique)
- 75 Figure 45 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis F (échelle semi-logarithmique)
- 77 Figure 46 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps après injection IV à 8 mg/kg chez les six brebis.
- 77 Figure 47 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps après injection IV à 8 mg/kg chez les six brebis (échelle semi-logarithmique)
- 78 Figure 48 : Oxyphénylbutazone plasmatique en fonction du temps après injection IV de phénylbutazone à 8 mg/kg chez les six brebis
- 78 Figure 49 : Concentration plasmatique d'oxyphénylbutazone en fonction du temps après injection IV de phénylbutazone à 8 mg/kg chez les six brebis (échelle semi-logarithmique)
- 79 Figure 50 : Illustration de l'effet de la transformation logarithmique de l'AUC sur l'homogénéité des variances. Les graphiques représentent les résidus du modèle statistique en fonction des estimateurs. A gauche pour l'AUC, à droite pour le logarithme de l'AUC.
- 79 Figure 51 : Illustration de l'effet de la transformation logarithmique du Cmax sur l'homogénéité des variances. Les graphiques représentent les résidus du modèle statistique en fonction des estimateurs. A gauche pour le Cmax, à droite pour le logarithme du Cmax.

# ANNEXES

## 1. Tableaux de résultats des mesures de CK plasmatique

Tableau 10a : Valeurs de CK et Différence CK – Base (B) pour les brebis A et B.

| Temps | Brebis A |     |        |      |        |      | Brebis B |     |        |     |        |     |
|-------|----------|-----|--------|------|--------|------|----------|-----|--------|-----|--------|-----|
|       | 2 ml     |     | 4 ml   |      | 8 ml   |      | 2 ml     |     | 4 ml   |     | 8 ml   |     |
|       | CK – B   | CK  | CK – B | CK   | CK – B | CK   | CK – B   | CK  | CK – B | CK  | CK – B | CK  |
| -60   | 46       |     | 71     |      | 1260   |      | 88       |     | 526    |     | 159    |     |
| -30   | 48       |     | 60     |      | 1310   |      | 64       |     | 409    |     | 168    |     |
| 0     | 49       |     | 61     |      | 1460   |      | 56       |     | 438    |     | 132    |     |
| Base  | 48       |     | 64     |      | 1343   |      | 69       |     | 458    |     | 153    |     |
| 15    | 1        | 49  | 50     | 114  | 147    | 1490 | 36       | 105 |        | 415 | 2      | 155 |
| 30    | 11       | 59  | 146    | 210  | 527    | 1870 | 56       | 125 | 16     | 474 | 60     | 213 |
| 45    | 10       | 58  | 309    | 373  | 1047   | 2390 | 37       | 106 | 81     | 539 | 94     | 247 |
| 60    | 24       | 72  | 503    | 567  | 1007   | 2350 | 51       | 120 | 164    | 622 | 144    | 297 |
| 120   | 32       | 80  | 1126   | 1190 | 2337   | 3680 | 60       | 129 | 362    | 820 | 281    | 434 |
| 240   | 50       | 98  | 1686   | 1750 | 3587   | 4930 | 53       | 122 | 205    | 663 | 328    | 481 |
| 360   | 76       | 124 | 1366   | 1430 | 2697   | 4040 | 74       | 143 | 60     | 518 | 335    | 488 |
| 480   | 68       | 116 | 1596   | 1660 | 2347   | 3690 | 75       | 144 | 57     | 515 | 328    | 481 |
| 600   | 82       | 130 | 1416   | 1480 | 1117   | 2460 | 83       | 152 |        | 448 | 236    | 389 |
| 720   | 86       | 134 | 1456   | 1520 | 817    | 2160 | 88       | 157 |        | 412 | 190    | 343 |
| 1440  | 37       | 85  | 886    | 950  |        | 1330 | 55       | 124 |        | 285 | 104    | 257 |
| 1920  | 30       | 78  | 806    | 870  |        | 970  | 25       | 94  |        | 215 | 76     | 229 |
| 2880  | 13       | 61  | 478    | 542  |        | 471  | 32       | 101 |        | 153 |        | 142 |
| 4320  | 8        | 56  | 113    | 177  |        | 202  | 20       | 89  |        | 119 |        | 51  |
| 5760  |          | 28  | 33     | 97   |        | 118  |          | 42  |        | 85  | 48     | 201 |
| 7200  |          | 43  | 73     | 137  |        | 70   |          | 65  |        | 159 |        | 145 |

Tableau 10b : Valeurs de CK et Différence CK – Base (B) pour les brebis C et D.

| Temps | Brebis C |     |        |      |        |      | Brebis D |     |        |      |        |      |
|-------|----------|-----|--------|------|--------|------|----------|-----|--------|------|--------|------|
|       | 2 ml     |     | 4 ml   |      | 8 ml   |      | 2 ml     |     | 4 ml   |      | 8 ml   |      |
|       | CK - B   | CK  | CK - B | CK   | CK - B | CK   | CK - B   | CK  | CK - B | CK   | CK - B | CK   |
| -60   | 43       |     | 294    |      | 42     |      | 100      |     | 450    |      | 77     |      |
| -30   | 43       |     | 283    |      | 37     |      | 80       |     | 446    |      | 64     |      |
| 0     | 43       |     | 267    |      | 42     |      | 101      |     | 403    |      | 74     |      |
| Base  | 43       |     | 281    |      | 40     |      | 94       |     | 433    |      | 72     |      |
| 15    | 45       | 88  | 52     | 333  | 57     | 97   | 10       | 104 |        | 430  | 83     | 155  |
| 30    | 83       | 126 | 164    | 445  | 169    | 209  | 29       | 123 | 61     | 494  | 189    | 261  |
| 45    | 112      | 155 | 300    | 581  | 295    | 335  | 68       | 162 | 174    | 607  | 249    | 321  |
| 60    | 142      | 185 | 469    | 750  | 435    | 475  | 101      | 195 | 297    | 730  | 380    | 452  |
| 120   | 167      | 210 | 1089   | 1370 | 940    | 980  | 271      | 365 | 987    | 1420 | 668    | 740  |
| 240   | 142      | 185 | 899    | 1180 | 1240   | 1280 | 360      | 454 | 1867   | 2300 | 1068   | 1140 |
| 360   | 163      | 206 | 999    | 1280 | 1140   | 1180 | 466      | 560 | 1837   | 2270 | 1258   | 1330 |
| 480   | 166      | 209 | 889    | 1170 | 1040   | 1080 | 492      | 586 | 1767   | 2200 | 1158   | 1230 |
| 600   | 165      | 208 | 589    | 870  | 980    | 1020 | 411      | 505 | 1367   | 1800 | 958    | 1030 |
| 720   | 190      | 233 | 559    | 840  | 960    | 1000 | 375      | 469 | 987    | 1420 | 948    | 1020 |
| 1440  | 133      | 176 | 289    | 570  | 710    | 750  | 178      | 272 | 186    | 619  | 868    | 940  |
| 1920  | 98       | 141 | 296    | 577  | 605    | 645  | 135      | 229 |        | 282  | 668    | 740  |
| 2880  | 66       | 109 |        | 273  | 320    | 360  | 60       | 154 |        | 116  | 335    | 407  |
| 4320  | 15       | 58  |        | 99   | 61     | 101  | 35       | 129 |        | 54   | 105    | 177  |
| 5760  | 8        | 51  |        | 111  | 3      | 43   |          | 65  |        | 157  | 6      | 78   |
| 7200  | 5        | 48  |        | 58   |        | 34   |          | 81  |        | 126  |        | 70   |

Tableau 10c : Valeurs de CK et Différence CK – Base (B) pour les brebis E et F.

| Temps | Brebis E |      |        |      |        |      | Brebis F |     |        |     |        |      |
|-------|----------|------|--------|------|--------|------|----------|-----|--------|-----|--------|------|
|       | 2 ml     |      | 4 ml   |      | 8 ml   |      | 2 ml     |     | 4 ml   |     | 8 ml   |      |
|       | CK - B   | CK   | CK - B | CK   | CK - B | CK   | CK - B   | CK  | CK - B | CK  | CK - B | CK   |
| -60   | 147      |      | 57     |      | 100    |      | 90       |     | 55     |     | 121    |      |
| -30   | 135      |      | 54     |      | 86     |      | 94       |     | 51     |     | 96     |      |
| 0     | 131      |      | 50     |      | 94     |      | 85       |     | 46     |     | 103    |      |
| Base  | 138      |      | 54     |      | 93     |      | 90       |     | 51     |     | 107    |      |
| 15    | 77       | 215  | 93     | 147  | 68     | 161  | 56       | 146 | 35     | 86  | 83     | 190  |
| 30    | 244      | 382  | 276    | 330  | 168    | 261  | 141      | 231 | 124    | 175 | 247    | 354  |
| 45    | 383      | 521  | 517    | 571  | 296    | 389  | 226      | 316 | 195    | 246 | 461    | 568  |
| 60    | 554      | 692  | 786    | 840  | 444    | 537  | 317      | 407 | 290    | 341 | 633    | 740  |
| 120   | 1202     | 1340 | 1766   | 1820 | 1367   | 1460 | 571      | 661 | 535    | 586 | 1613   | 1720 |
| 240   | 1462     | 1600 | 1946   | 2000 | 2547   | 2640 | 680      | 770 | 539    | 590 | 2173   | 2280 |
| 360   | 1642     | 1780 | 1786   | 1840 | 2627   | 2720 | 660      | 750 | 558    | 609 | 1923   | 2030 |
| 480   | 1552     | 1690 | 1766   | 1820 | 3687   | 3780 | 700      | 790 | 572    | 623 | 3893   | 4000 |
| 600   | 1422     | 1560 | 1306   | 1360 | 4687   | 4780 | 619      | 709 | 462    | 513 | 1683   | 1790 |
| 720   | 1472     | 1610 | 1516   | 1570 | 4787   | 4880 | 529      | 619 | 487    | 538 | 1363   | 1470 |
| 1440  | 612      | 750  | 836    | 890  | 5847   | 5940 | 303      | 393 | 264    | 315 | 823    | 930  |
| 1920  | 412      | 550  | 766    | 820  | 4037   | 4130 | 207      | 297 | 166    | 217 | 703    | 810  |
| 2880  | 177      | 315  | 480    | 534  | 2337   | 2430 | 138      | 228 | 114    | 165 | 555    | 662  |
| 4320  | 36       | 174  | 134    | 188  | 425    | 518  |          | 87  | 38     | 89  | 225    | 332  |
| 5760  | 11       | 149  | 15     | 69   | 45     | 138  |          | 86  |        | 43  | 18     | 125  |
| 7200  |          | 73   | 80     | 134  |        | 83   |          | 69  | 1      | 52  |        | 78   |

## 2. Courbes de l'activité CK plasmatique (U/l) en fonction du temps pour les six brebis :

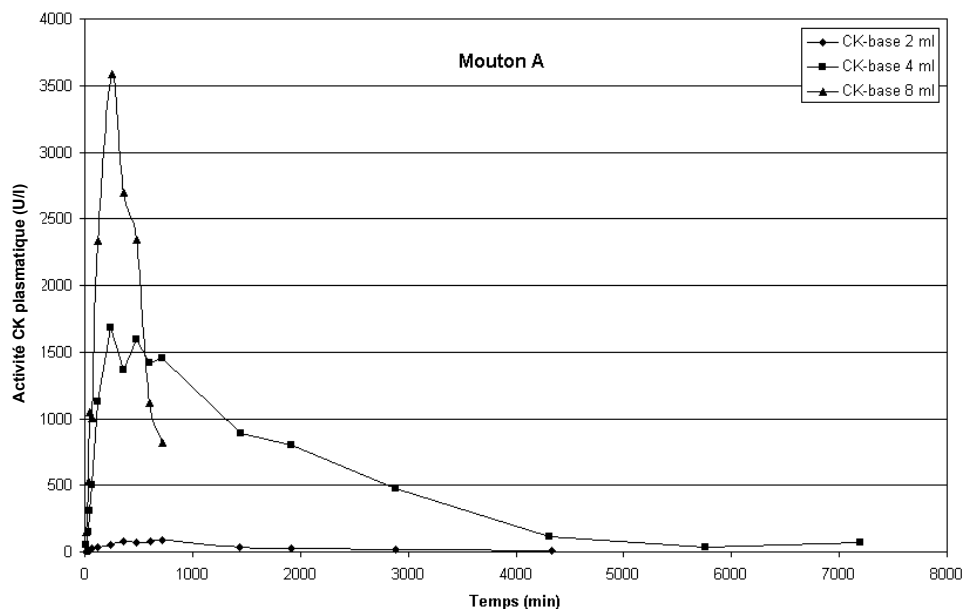


Figure 10 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis A.

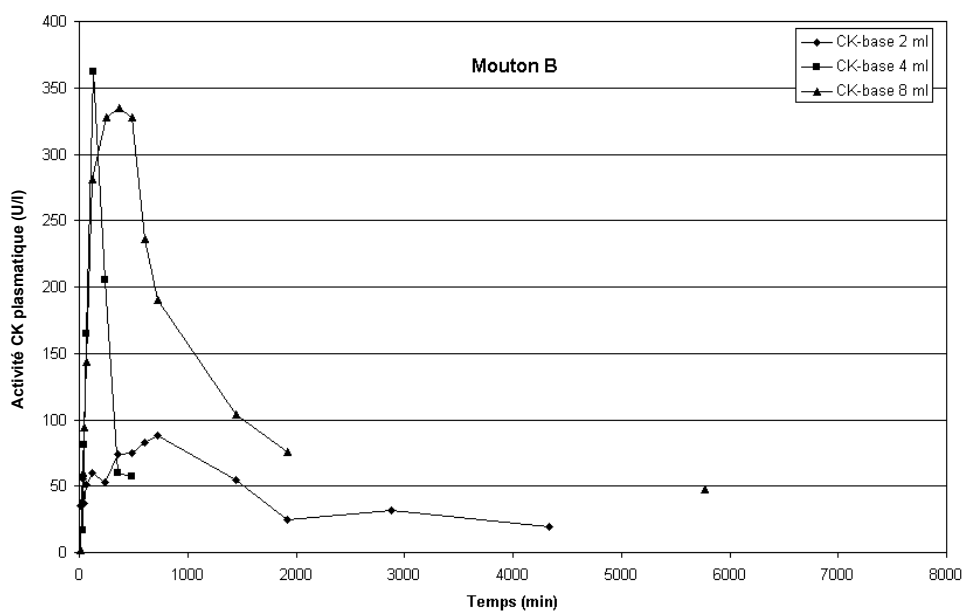


Figure 11 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis B.

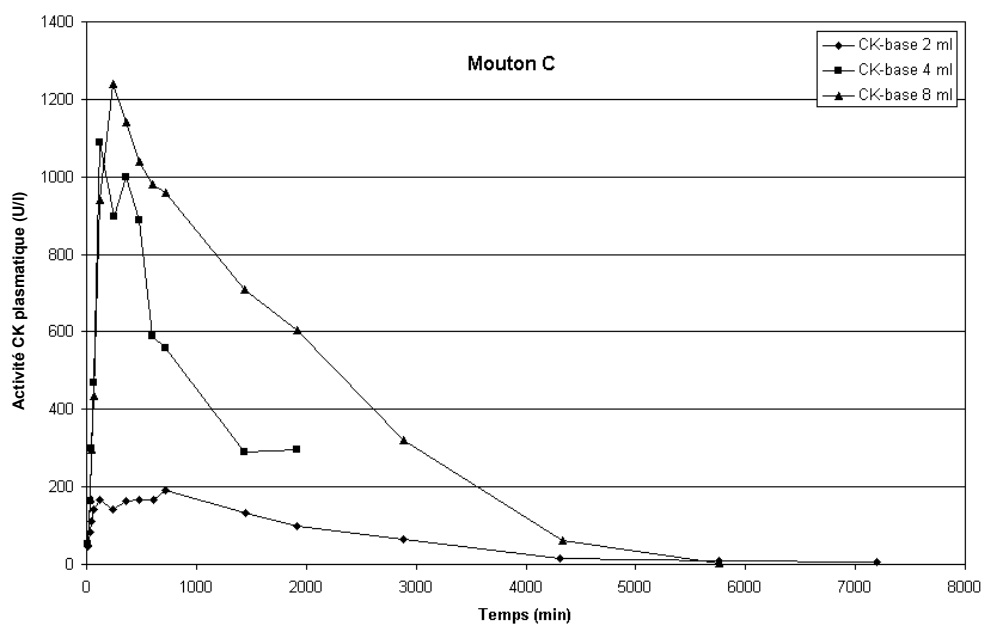


Figure 12 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis C.

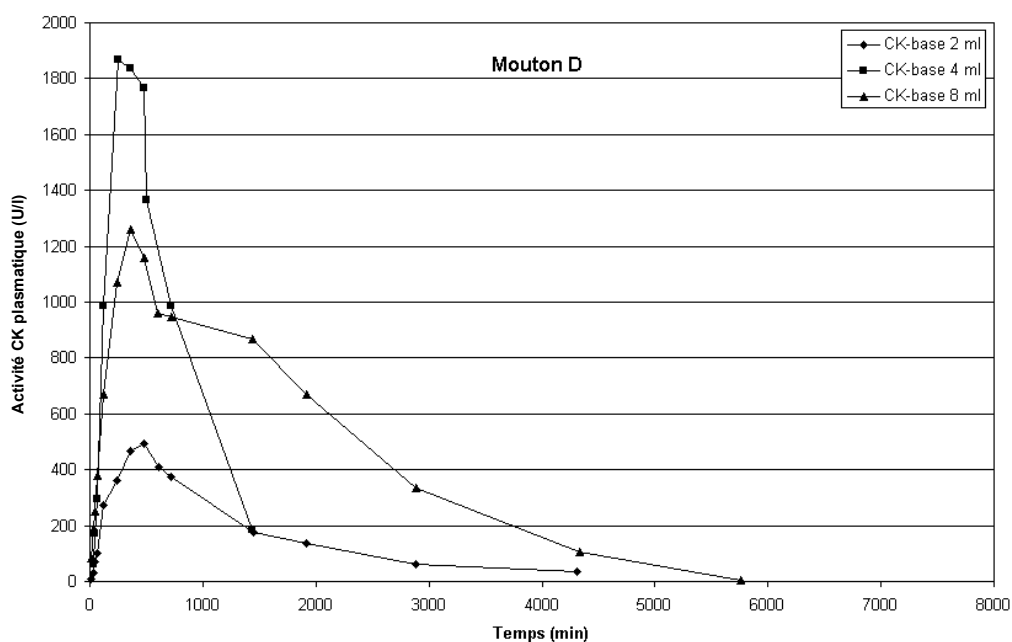


Figure 13 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis D.



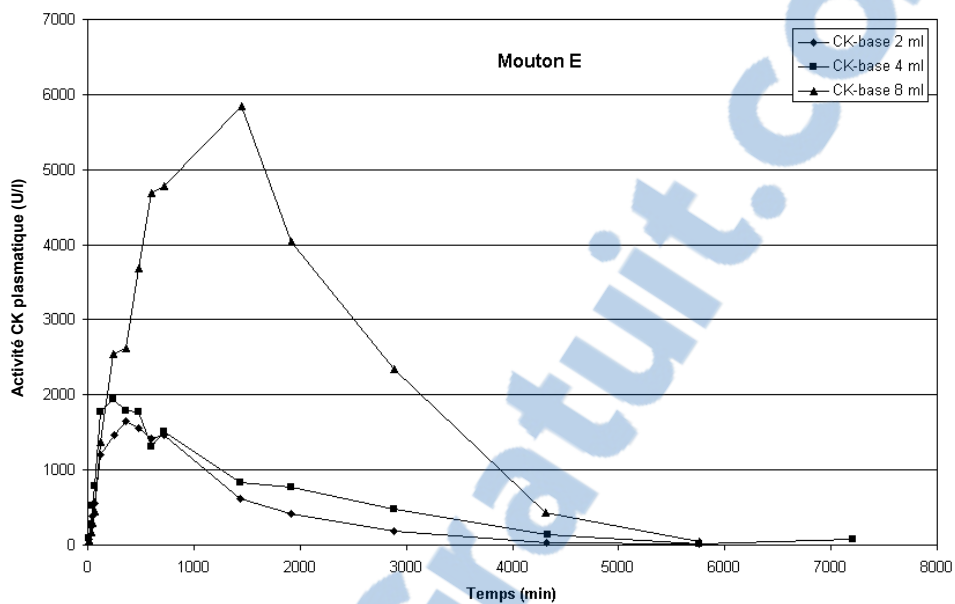


Figure 14 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis E.

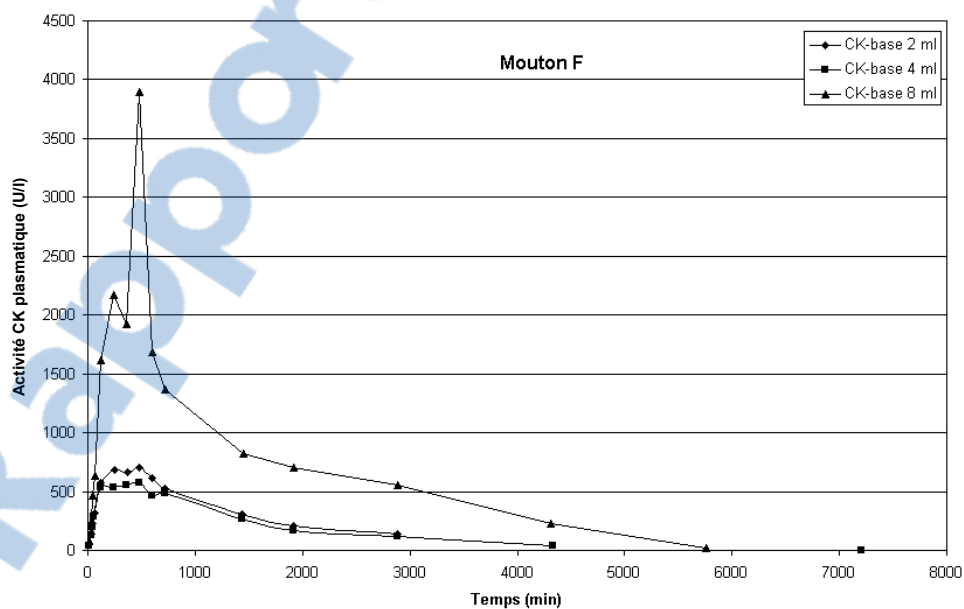


Figure 15 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis F.

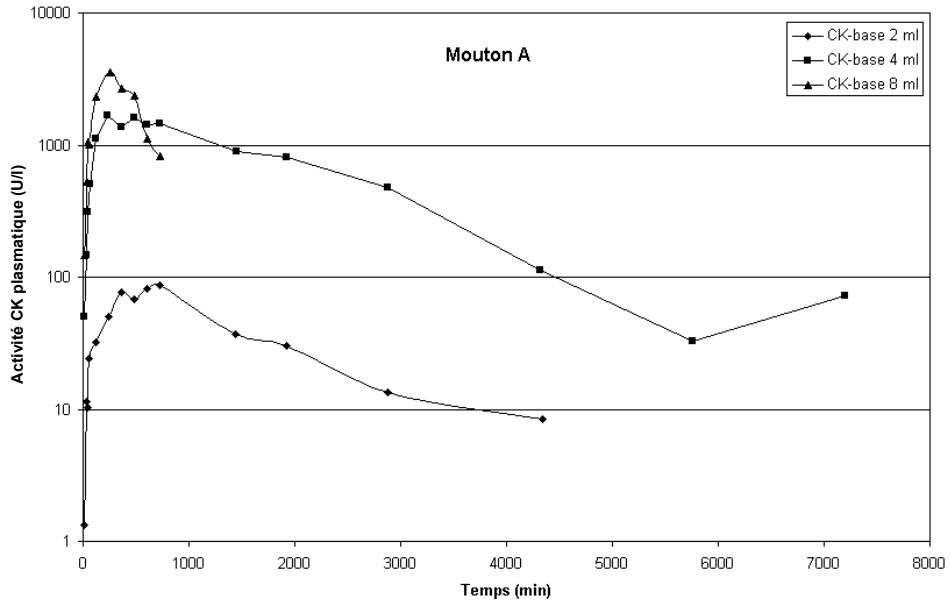


Figure 16 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis A (échelle semi-logarithmique).

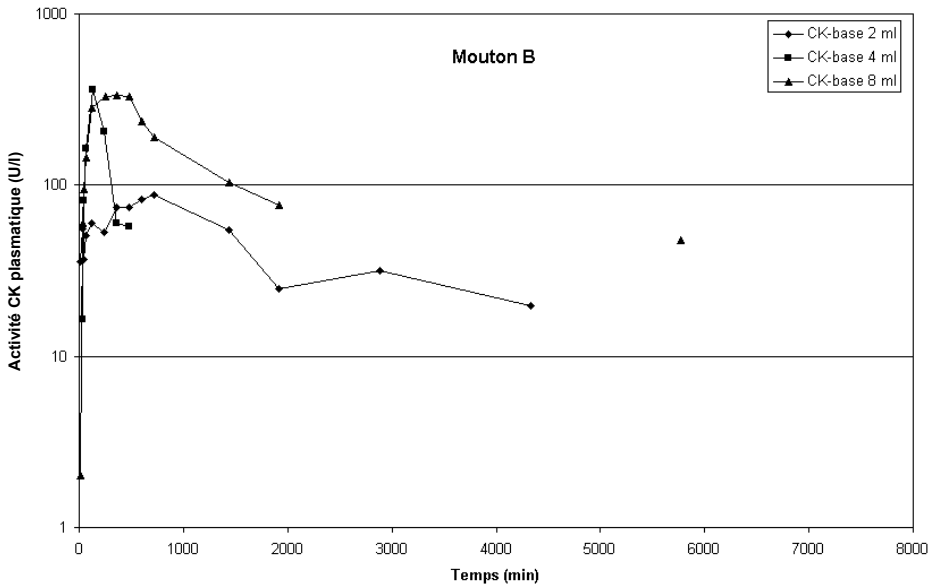


Figure 17 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis B (échelle semi-logarithmique).

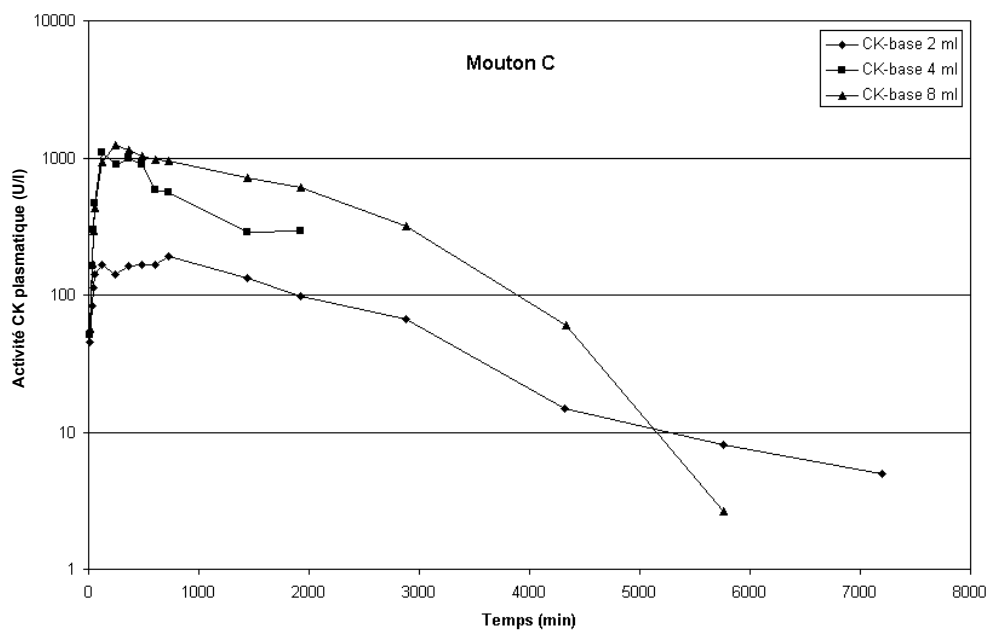


Figure 18 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis C (échelle semi-logarithmique).

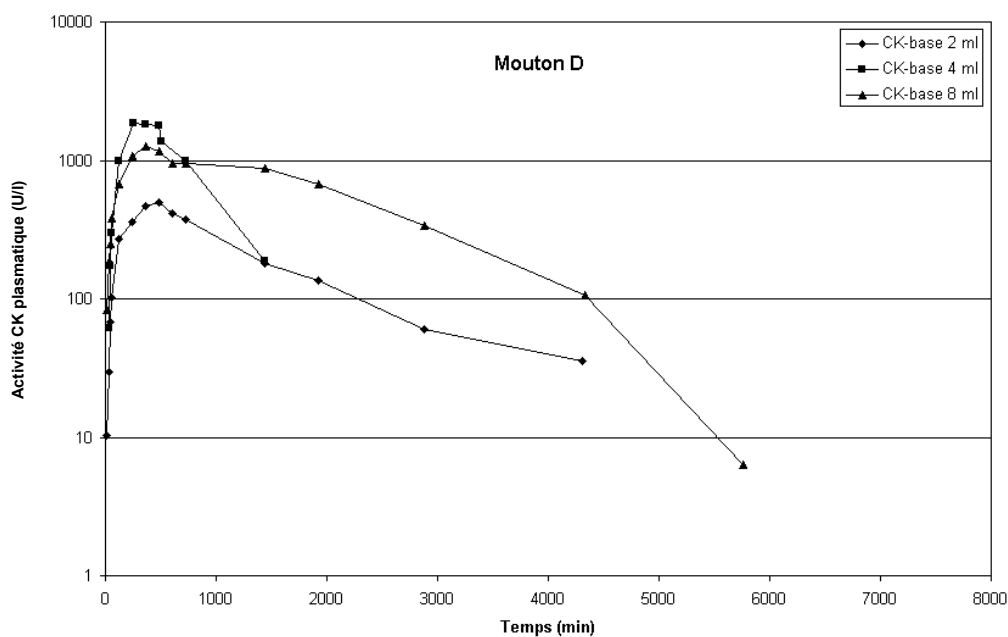


Figure 19 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis D (échelle semi-logarithmique).

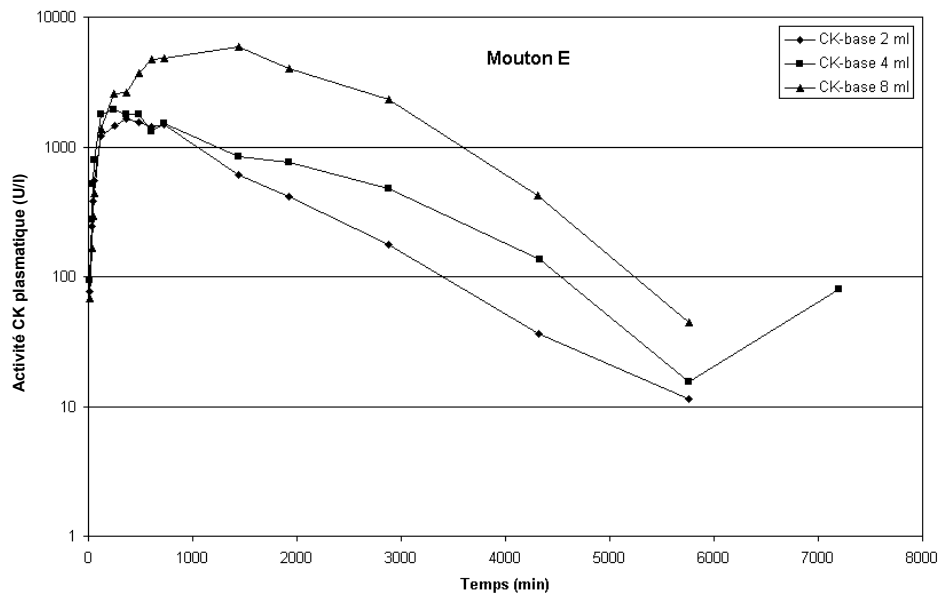


Figure 20 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis E (échelle semi-logarithmique).

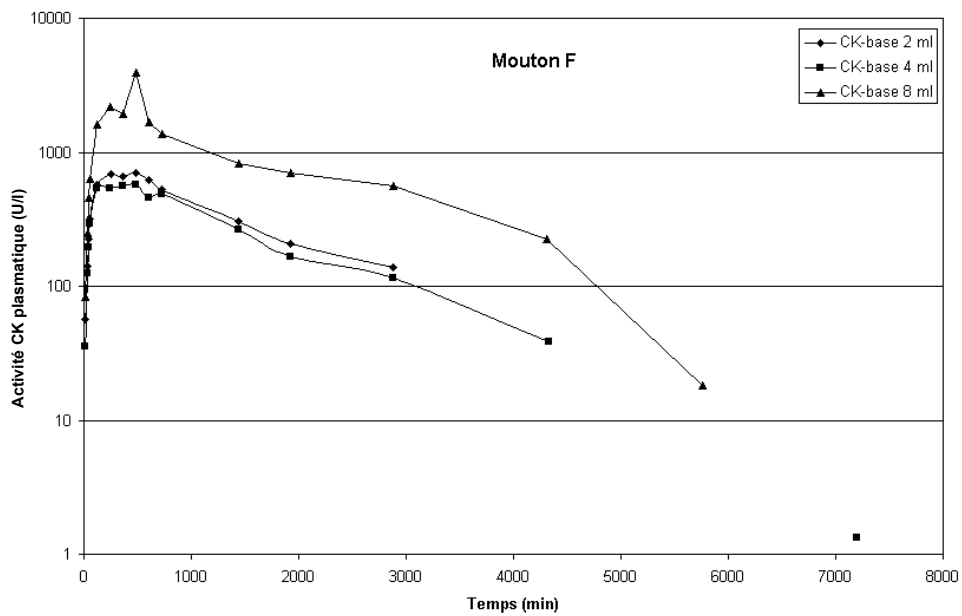


Figure 21 : Concentration d'activité CK plasmatique en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis F (échelle semi-logarithmique).

### 3. Doses individuelles de phénylbutazone reçues en IM et en IV

Tableau 11 : Doses individuelles de phénylbutazone reçues par chaque brebis pour les trois volumes administrés en intramusculaire.

| Brebis n° | Volume injecté IM ml | Poids vif kg | Dose administrée mg/kg |
|-----------|----------------------|--------------|------------------------|
| A         | 2                    | 75           | 5,15                   |
|           | 4                    | 72           | 10,95                  |
|           | 8                    | 77           | 20,00                  |
| B         | 2                    | 70           | 5,31                   |
|           | 4                    | 73           | 10,78                  |
|           | 8                    | 72           | 22,16                  |
| C         | 2                    | 73           | 5,36                   |
|           | 4                    | 72           | 11,10                  |
|           | 8                    | 72           | 22,79                  |
| D         | 2                    | 87           | 4,46                   |
|           | 4                    | 91           | 8,74                   |
|           | 8                    | 87           | 17,97                  |
| E         | 2                    | 65           | 6,00                   |
|           | 4                    | 66           | 11,87                  |
|           | 8                    | 65           | 24,77                  |
| F         | 2                    | 81           | 4,79                   |
|           | 4                    | 82           | 9,73                   |
|           | 8                    | 80           | 19,92                  |

Tableau 12 : Doses individuelles de phénylbutazone reçues par chaque brebis après injection intraveineuse.

| Brebis n° | Poids vif kg | Dose administrée mg/kg |
|-----------|--------------|------------------------|
| A         | 72           | 8,06                   |
| B         | 71           | 7,89                   |
| C         | 69           | 8,12                   |
| D         | 84           | 8,10                   |
| E         | 65           | 8,00                   |
| F         | 80           | 8,00                   |

#### 4. Tableaux de résultats des dosages de phénylbutazone

Tableau 13a : Concentration plasmatique de phénylbutazone ( $\mu\text{g/ml}$ ) en fonction du volume injecté, pour les brebis A, B et C. nd : non detected, blq: below limit of quantification ( $0.25 \mu\text{g/ml}$ ).

| Temps | A     |       |        | B     |       |        | C     |       |        |
|-------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
|       | 2 ml  | 4 ml  | 8 ml   | 2 ml  | 4 ml  | 8 ml   | 2 ml  | 4 ml  | 8 ml   |
| 15    | 2,53  | 39,14 | 65,39  | 5,61  | 45,70 | 13,79  | 18,95 | 48,62 | 48,25  |
| 30    | 6,12  | 56,32 | 88,81  | 11,01 | 67,94 | 10,73  | 31,75 | 73,18 | 76,57  |
| 45    | 8,91  | 64,41 | 96,33  | 13,84 | 79,11 | 17,25  | 31,31 | 82,56 | 83,96  |
| 60    | 12,37 | 65,82 | 96,00  | 17,59 | 76,71 | 24,74  | 35,42 | 83,94 | 89,70  |
| 120   | 25,79 | 70,49 | 110,06 | 32,39 | 83,35 | 46,42  | 35,83 | 82,57 | 118,66 |
| 240   | 47,07 | 62,48 | 118,90 | 39,91 | 78,70 | 113,33 | 37,05 | 75,83 | 116,68 |
| 360   | 47,08 | 64,15 | 115,55 | 40,01 | 77,92 | 128,87 | 28,64 | 71,08 | 131,70 |
| 480   | 39,38 | 66,44 | 111,49 | 42,28 | 73,67 | 143,93 | 26,29 | 62,83 | 120,27 |
| 600   | 41,38 | 61,34 | 103,69 | 40,68 | 63,28 | 148,65 | 25,81 | 55,76 | 110,04 |
| 720   | 35,60 | 57,50 | 97,74  | 40,51 | 65,63 | 139,09 | 23,40 | 55,24 | 112,01 |
| 1440  | 23,05 | 40,38 | 81,37  | 31,69 | 45,62 | 110,10 | 14,78 | 37,37 | 79,38  |
| 1920  | 17,42 | 32,35 | 63,54  | 24,12 | 34,20 | 93,06  | 8,45  | 25,07 | 69,84  |
| 2880  | 9,46  | 16,87 | 44,86  | 15,68 | 22,84 | 53,93  | 4,43  | 15,01 | 38,55  |
| 4320  | 4,34  | 7,31  | 20,31  | 6,65  | 8,88  | 26,60  | 1,50  | 4,51  | 17,32  |
| 5760  | 1,68  | 2,18  | 9,88   | 2,73  | 3,24  | 10,21  | blq   | 1,95  | 5,30   |
| 7200  | 0,58  | 0,72  | 4,73   | 0,95  | 1,23  | 3,25   | nd    | 0,67  | 1,83   |

Tableau 13b : Concentration plasmatique de phénylbutazone ( $\mu\text{g/ml}$ ) en fonction du volume injecté, pour les brebis D, E et F. nd : non detected, blq: below limit of quantification ( $0.25 \mu\text{g/ml}$ ).

| Temps | D    |       |        | E     |       |        | F     |       |        |
|-------|------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
|       | 2 ml | 4 ml  | 8 ml   | 2 ml  | 4 ml  | 8 ml   | 2 ml  | 4 ml  | 8 ml   |
| 15    | 24   | 32,83 | 58,75  | 25,37 | 53,45 | 46,14  | 26,34 | 25,43 | 74,52  |
| 30    | 35   | 47,58 | 75,26  | 34,94 | 66,27 | 60,38  | 32,62 | 40,05 | 89,32  |
| 45    | 40   | 59,93 | 84,12  | 40,24 | 72,60 | 69,96  | 39,45 | 46,10 | 92,70  |
| 60    | 43   | 57,50 | 95,38  | 42,23 | 77,58 | 75,35  | 39,50 | 49,71 | 96,50  |
| 120   | 42   | 67,24 | 109,03 | 44,55 | 75,59 | 92,40  | 40,68 | 57,12 | 101,47 |
| 240   | 34   | 65,90 | 108,52 | 42,54 | 69,72 | 98,44  | 39,01 | 61,68 | 105,86 |
| 360   | 33   | 55,70 | 109,04 | 40,60 | 60,78 | 98,70  | 38,59 | 62,62 | 103,00 |
| 480   | 26   | 55,74 | 106,63 | 35,27 | 65,94 | 100,22 | 34,41 | 60,75 | 105,47 |
| 600   | 24   | 51,87 | 101,61 | 32,62 | 56,71 | 93,27  | 29,17 | 53,38 | 96,53  |
| 720   | 22   | 43,42 | 101,48 | 29,51 | 55,07 | 90,35  | 27,22 | 52,79 | 95,95  |
| 1440  | 14   | 28,73 | 77,06  | 17,18 | 36,12 | 75,54  | 17,02 | 35,02 | 68,99  |
| 1920  | 9    | 21,93 | 62,56  | 15,16 | 26,74 | 57,30  | 11,89 | 26,82 | 54,97  |
| 2880  | 5    | 15,46 | 42,26  | 7,95  | 14,08 | 33,47  | 5,05  | 14,19 | 25,57  |
| 4320  | 1    | 8,82  | 18,66  | 2,61  | 5,51  | 14,43  | 2,02  | 5,56  | 13,61  |
| 5760  | 0,31 | 4,86  | 9,12   | 0,87  | 1,73  | 5,03   | 0,94  | 1,94  | 5,83   |
| 7200  | nd   | 2,85  | 3,84   | 0,45  | 0,60  | 2,04   | nd    | 0,60  | 2,08   |

## 5. Courbes de concentration plasmatique en phénylbutazone en fonction du temps pour les six brebis :

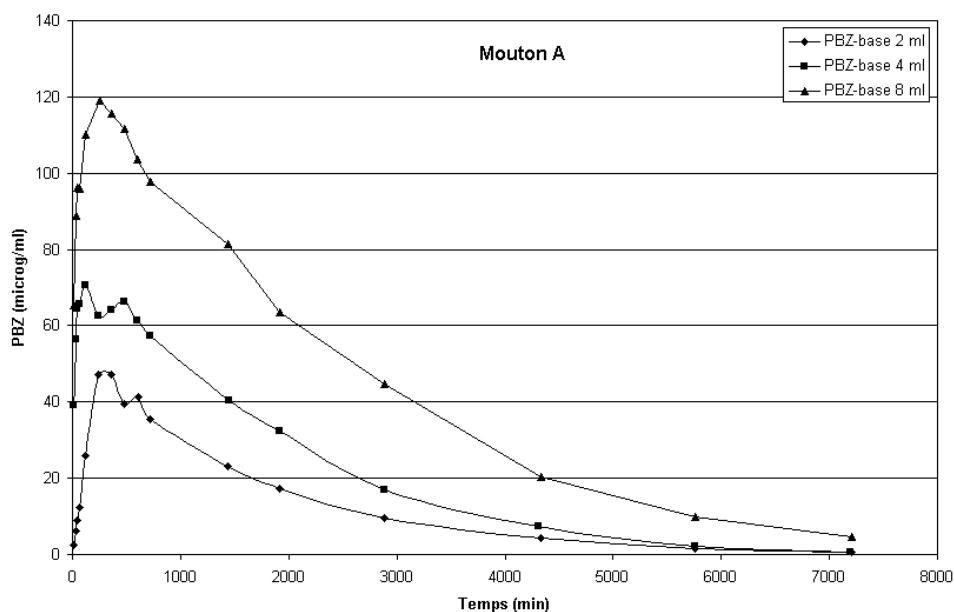


Figure 22 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis A.

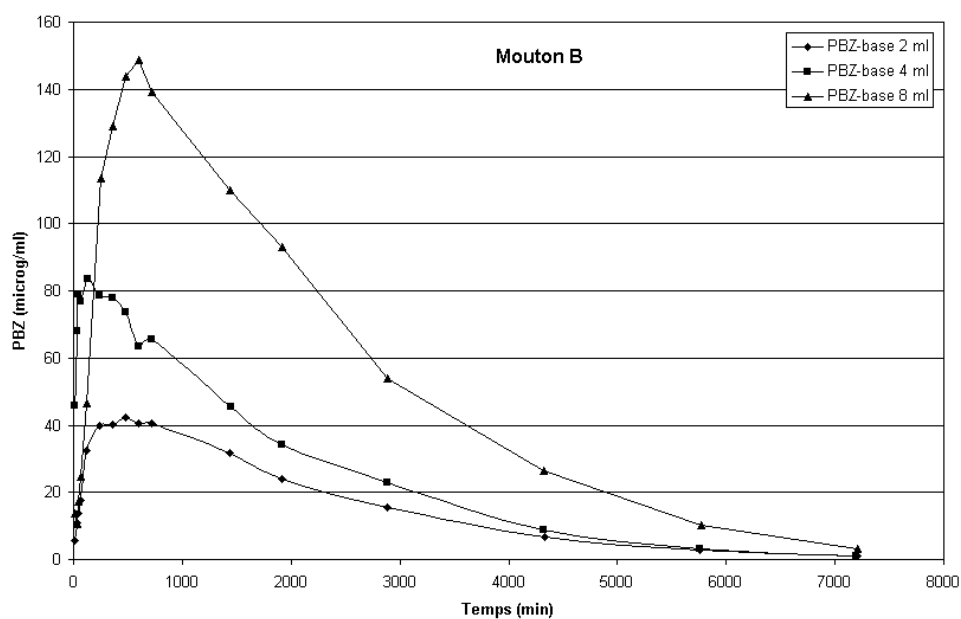


Figure 23 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis B.

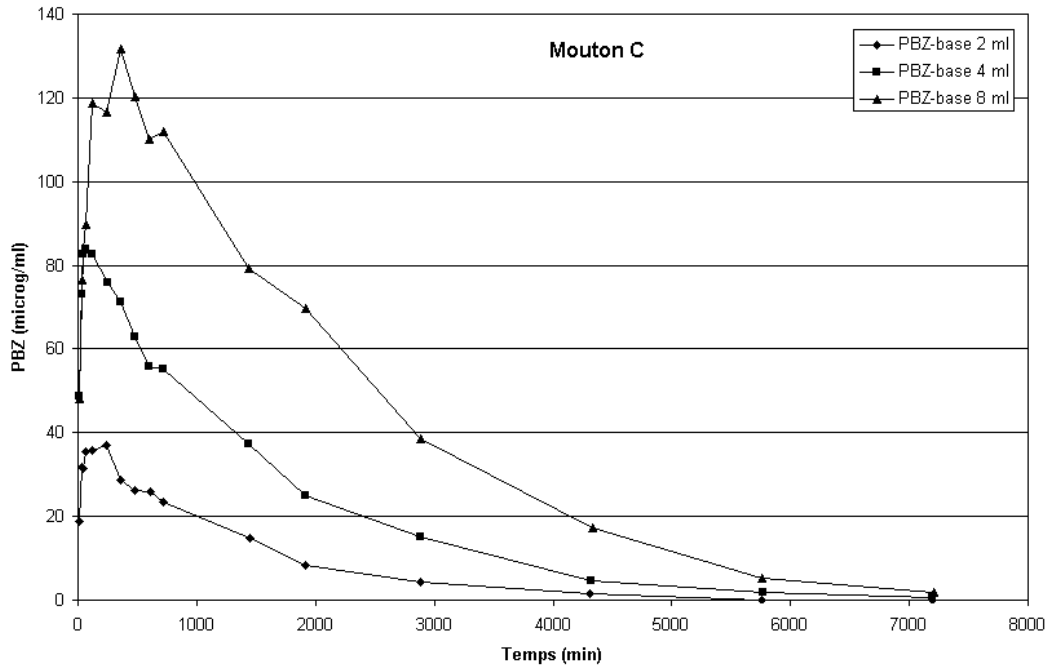


Figure 24: Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis C.

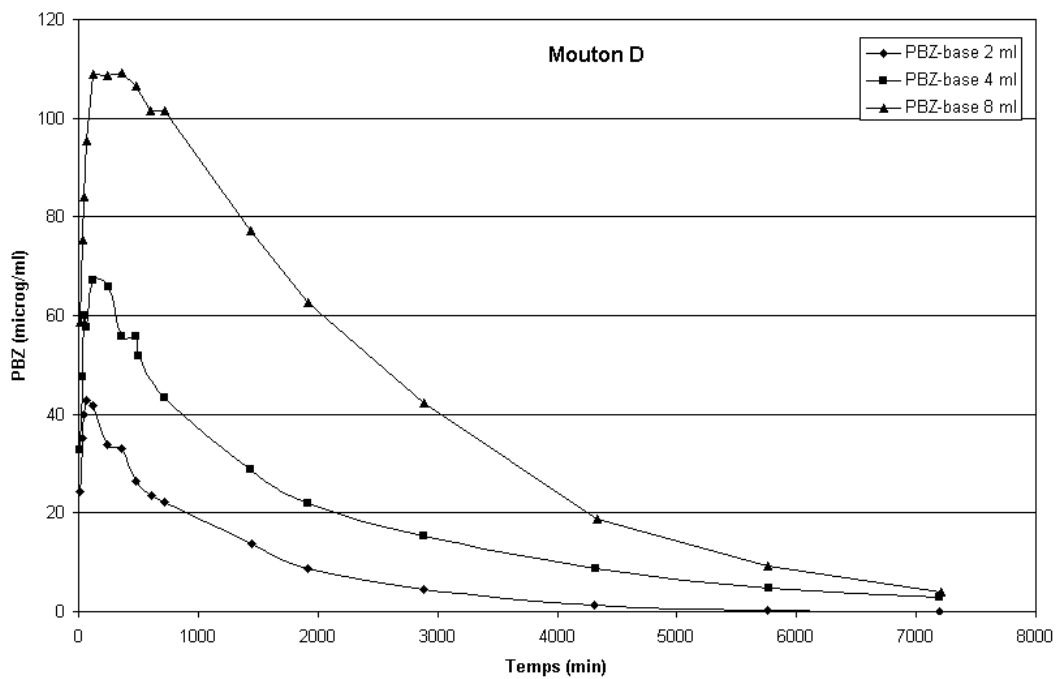


Figure 25 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis D.



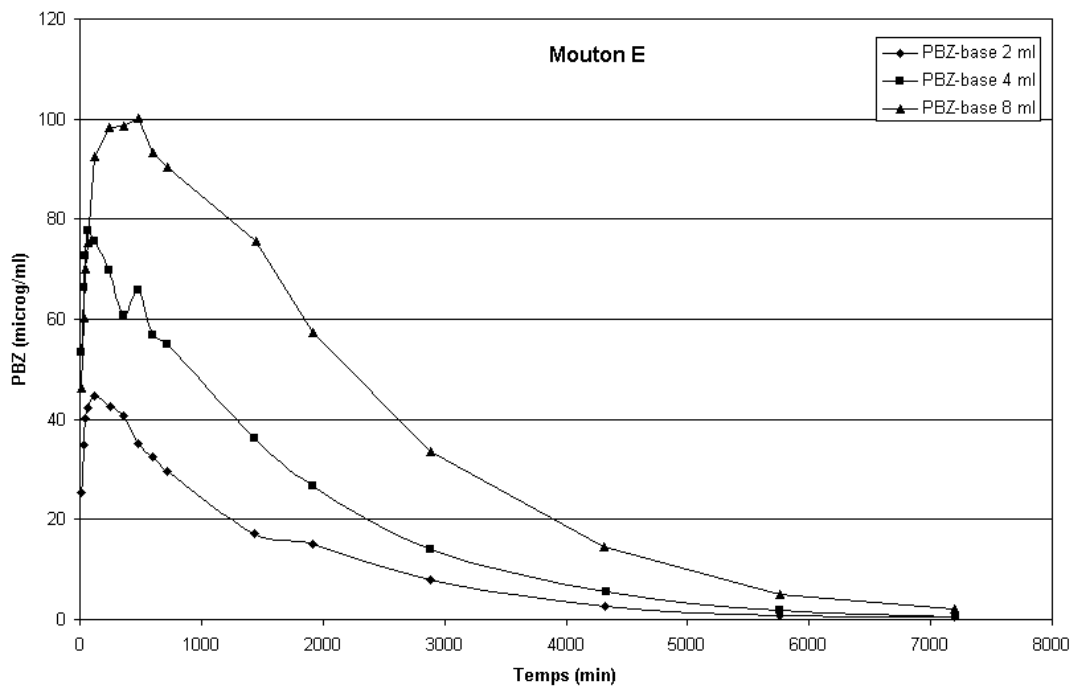


Figure 26 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis E.

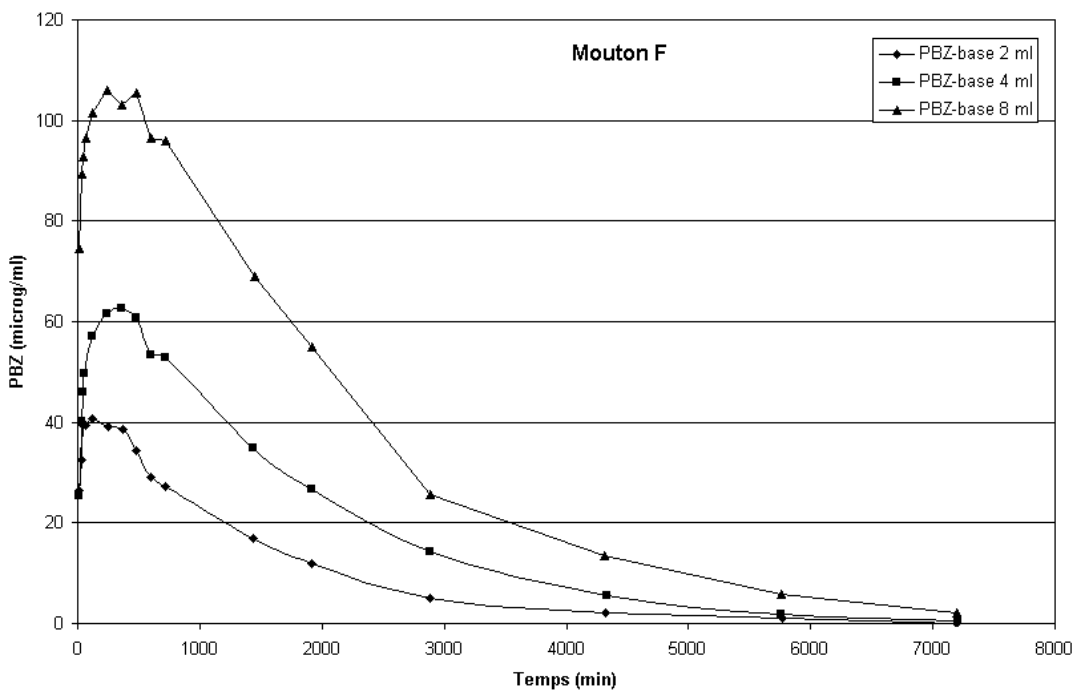


Figure 27 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis F.

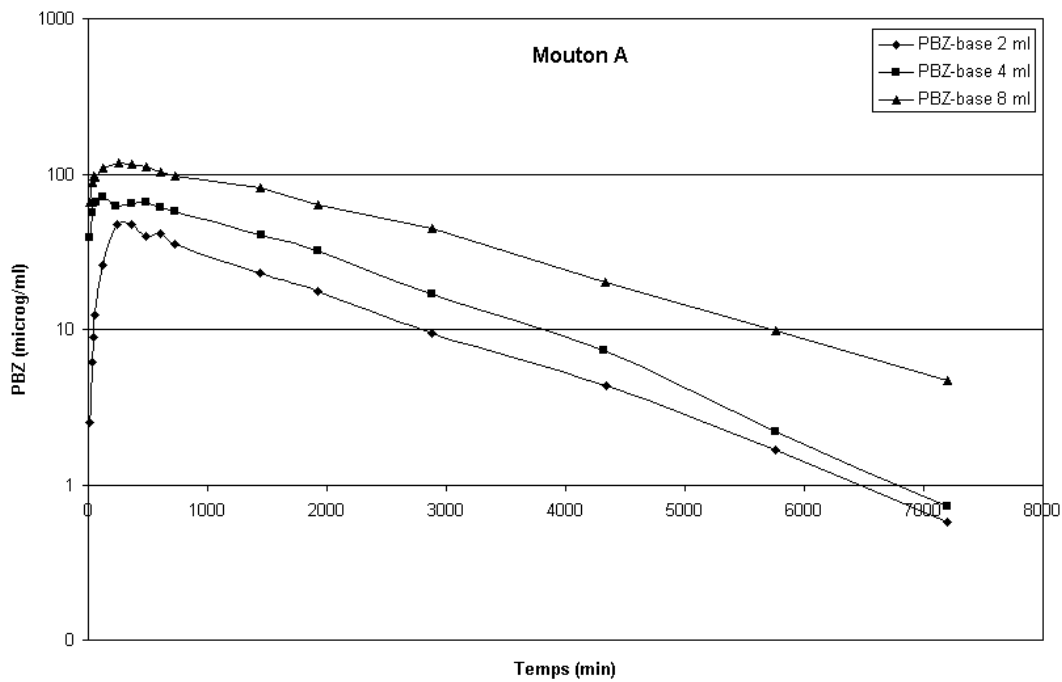


Figure 28 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis A (échelle semi-logarithmique).

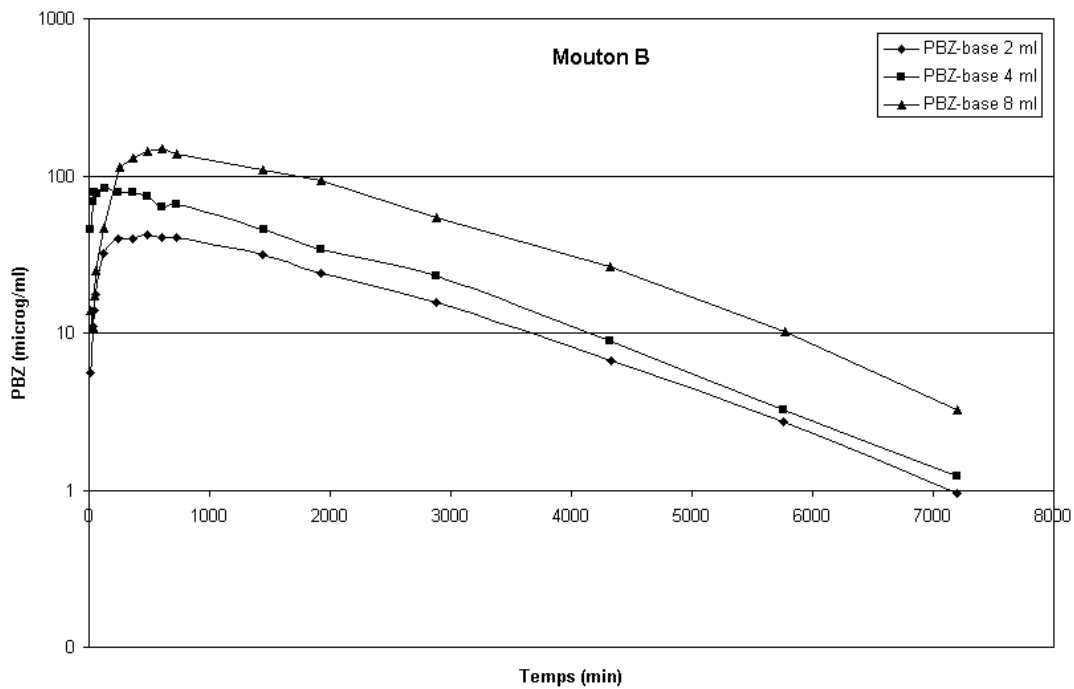


Figure 29 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis B (échelle semi-logarithmique).

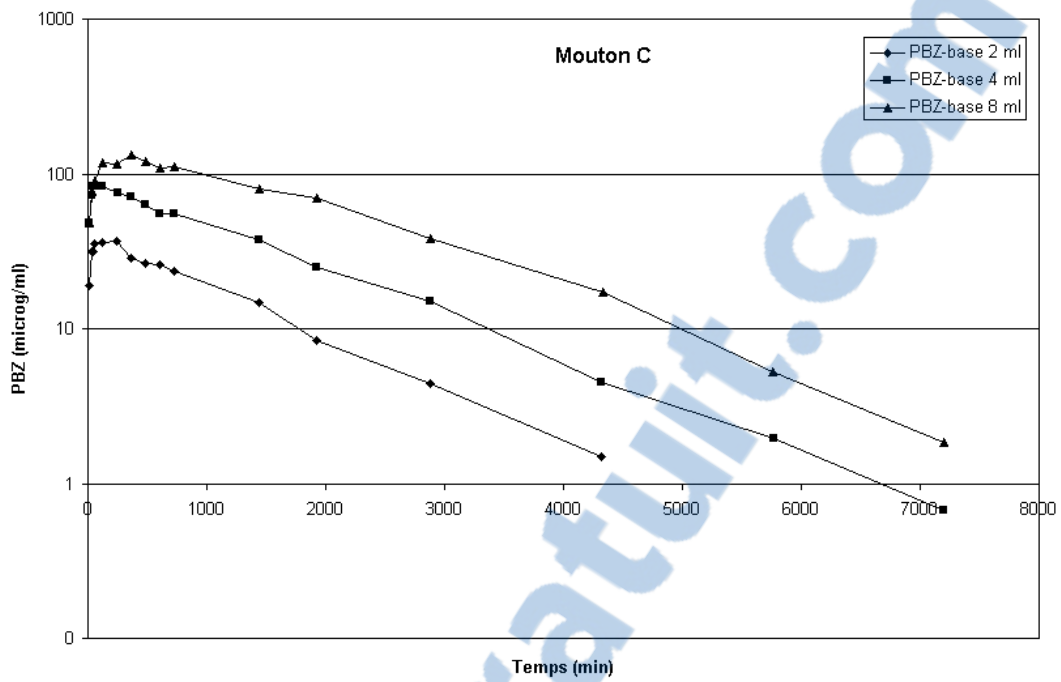


Figure 30 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis C (échelle semi-logarithmique).

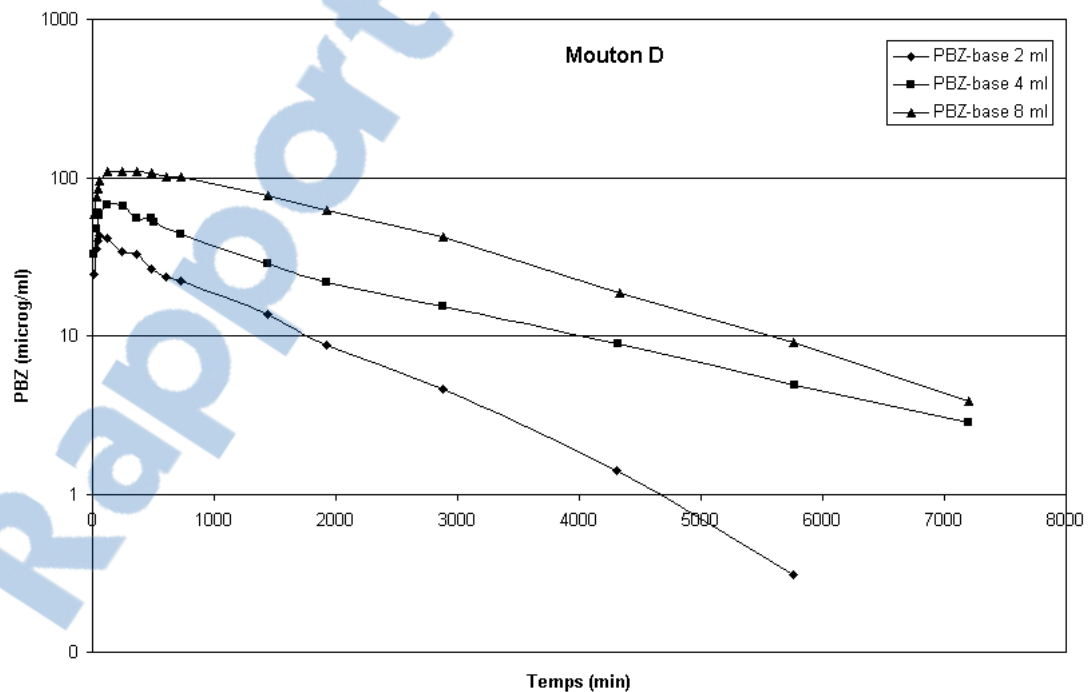


Figure 31 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis D (échelle semi-logarithmique).

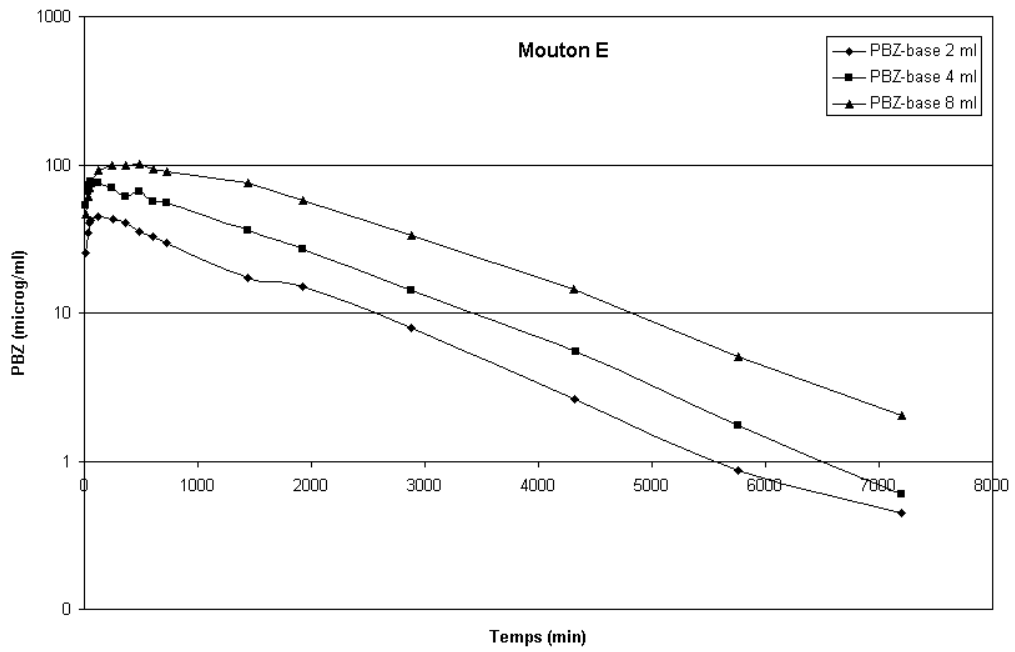


Figure 32 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps pour la brebis E (échelle semi-logarithmique).

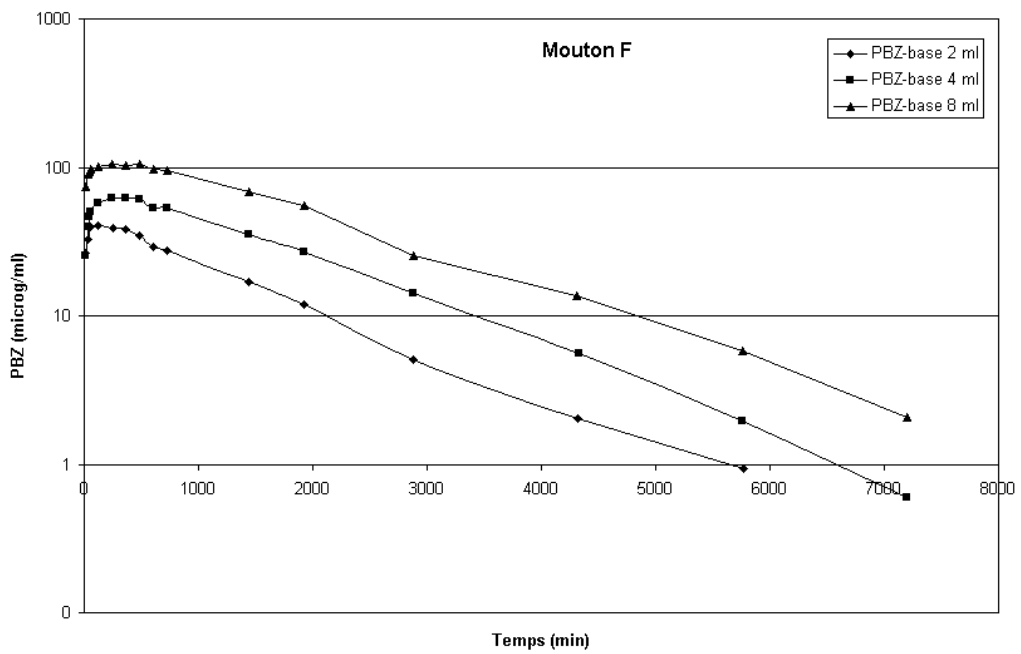


Figure 33 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps pour la brebis F (échelle semi-logarithmique).

## 6. Tableau de résultats des mesures d'oxyphénylbutazone

Tableau 14a : Concentration plasmatique d'oxyphénylbutazone ( $\mu\text{g/ml}$ ) en fonction du volume de phénylbutazone injecté, chez les brebis A, B et C. nd : non detected, blq: below limit of quantification (0.20  $\mu\text{g/ml}$ ).

| Temps | A    |      |      | B    |      |      | C    |      |      |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|       | 2 ml | 4 ml | 8 ml | 2 ml | 4 ml | 8 ml | 2 ml | 4 ml | 8 ml |
| 15    | nd   | 0,30 | 0,34 | nd   | blq  | nd   | nd   | 0,35 | blq  |
| 30    | nd   | 0,56 | 0,82 | nd   | 0,64 | nd   | 0,42 | 0,72 | 0,35 |
| 45    | nd   | 1,02 | 1,28 | nd   | 1,11 | blq  | 0,55 | 1,12 | 0,88 |
| 60    | nd   | 1,14 | 1,57 | blq  | 1,40 | 0,33 | 0,81 | 1,53 | 1,46 |
| 120   | blq  | 1,61 | 2,24 | blq  | 2,78 | 0,77 | 1,07 | 2,11 | 2,72 |
| 240   | 0,68 | 1,75 | 3,27 | 0,39 | 2,38 | 2,09 | 1,62 | 2,41 | 3,73 |
| 360   | 1,34 | 1,69 | 3,54 | 0,72 | 1,80 | 2,48 | 1,58 | 2,56 | 4,45 |
| 480   | 1,62 | 1,92 | 3,70 | 0,88 | 1,57 | 2,68 | 1,35 | 2,84 | 3,90 |
| 600   | 1,57 | 1,84 | 3,55 | 1,03 | 1,60 | 2,35 | 1,33 | 2,41 | 4,12 |
| 720   | 1,50 | 1,83 | 2,51 | 1,16 | 1,52 | 2,48 | 1,16 | 2,28 | 4,17 |
| 1440  | 0,81 | 1,55 | 1,88 | 0,43 | 1,00 | 1,70 | 0,94 | 1,47 | 2,79 |
| 1920  | 0,46 | 0,91 | 1,66 | 0,31 | 0,73 | 1,74 | 0,54 | 1,23 | 2,00 |
| 2880  | 0,27 | 0,70 | 1,12 | blq  | 0,50 | 1,25 | 0,36 | 0,73 | 1,29 |
| 4320  | blq  | 0,38 | 0,67 | nd   | 0,40 | 0,77 | nd   | 0,52 | 0,42 |
| 5760  | nd   | blq  | 0,29 | nd   | blq  | 0,54 | nd   | 0,22 | 0,24 |
| 7200  | nd   | nd   | 0,22 | nd   | nd   | blq  | nd   | nd   | nd   |

Tableau 14b : Concentration plasmatique d'oxyphénylbutazone ( $\mu\text{g/ml}$ ) en fonction du volume de phénylbutazone injecté, chez les brebis D, E, F. nd : non detected, blq: below limit of quantification (0.20  $\mu\text{g/ml}$ ).

| Temps | D    |      |      | E    |      |      | F    |      |      |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|       | 2 ml | 4 ml | 8 ml | 2 ml | 4 ml | 8 ml | 2 ml | 4 ml | 8 ml |
| 15    | 0,23 | 0,28 | blq  | 0,23 | blq  | 0,38 | nd   | nd   | 0,33 |
| 30    | 0,33 | 0,36 | 0,39 | 0,37 | 0,67 | 0,79 | 0,24 | blq  | 1,02 |
| 45    | 0,59 | 0,66 | 0,62 | 0,51 | 1,29 | 1,45 | 0,33 | 0,37 | 1,41 |
| 60    | 0,63 | 0,99 | 1,13 | 0,57 | 1,73 | 2,11 | 0,51 | 0,53 | 2,24 |
| 120   | 1,00 | 1,78 | 2,19 | 1,02 | 3,06 | 4,01 | 0,82 | 1,13 | 3,30 |
| 240   | 1,26 | 2,08 | 3,44 | 1,43 | 3,38 | 4,98 | 1,33 | 1,84 | 3,85 |
| 360   | 1,44 | 2,36 | 3,86 | 1,50 | 4,19 | 5,03 | 1,84 | 2,58 | 5,67 |
| 480   | 1,37 | 2,82 | 4,03 | 1,46 | 4,40 | 4,54 | 2,25 | 2,96 | 4,39 |
| 600   | 1,51 | 2,84 | 3,73 | 1,61 | 3,95 | 4,44 | 2,37 | 3,21 | 4,70 |
| 720   | 1,23 | 3,33 | 3,80 | 1,44 | 3,54 | 4,96 | 2,00 | 3,12 | 4,47 |
| 1440  | 0,75 | 1,35 | 3,69 | 0,85 | 2,79 | 3,43 | 0,91 | 2,39 | 1,90 |
| 1920  | 0,75 | 1,03 | 2,37 | 0,68 | 2,01 | 2,46 | 0,63 | 1,27 | 1,16 |
| 2880  | blq  | 0,53 | 0,89 | 0,39 | 0,49 | 1,35 | 0,31 | 0,47 | 0,75 |
| 4320  | nd   | 0,62 | 0,48 | 0,22 | blq  | 0,53 | nd   | blq  | 0,38 |
| 5760  | nd   | 0,39 | 0,34 | nd   | nd   | 0,28 | nd   | nd   | 0,26 |
| 7200  | nd   | 0,38 | blq  | nd   | nd   | blq  | nd   | nd   | blq  |

## 7. Courbes de concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps pour les six brebis

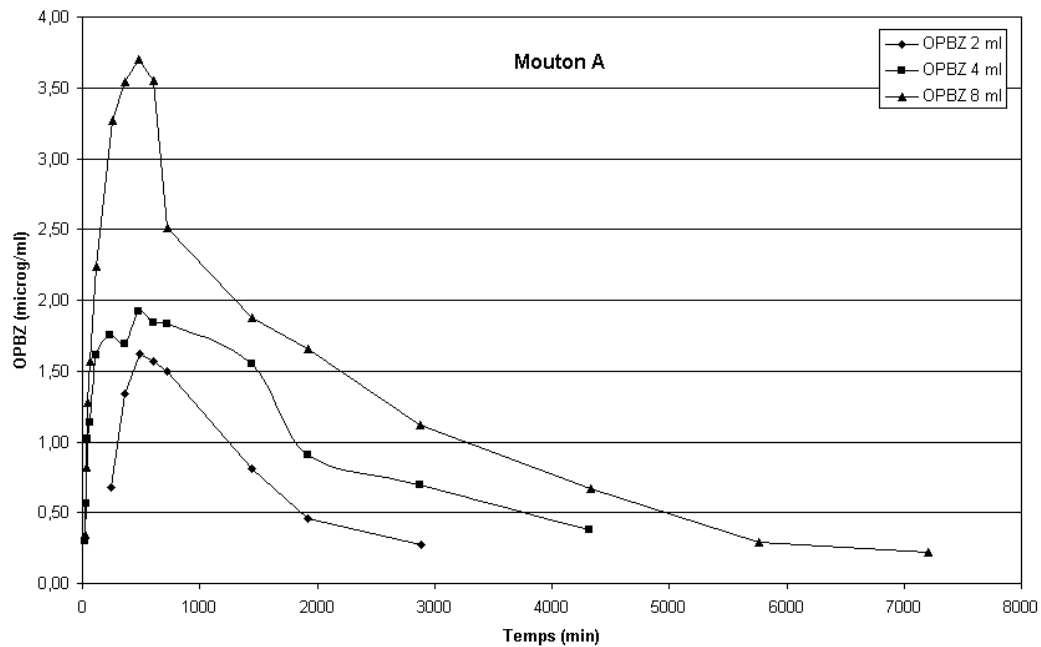


Figure 34 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis A.

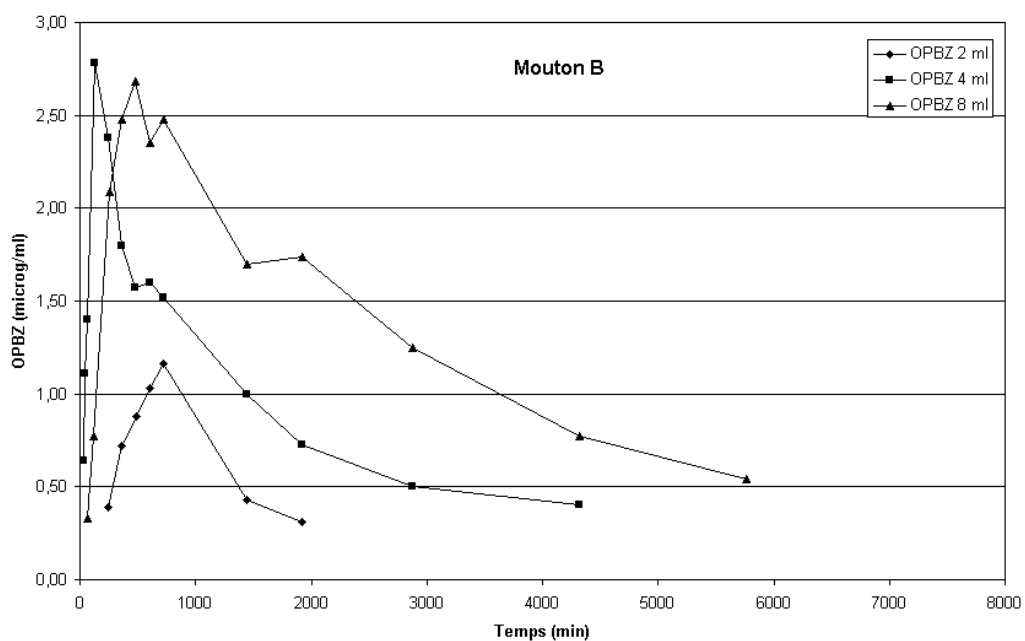


Figure 35 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis B.

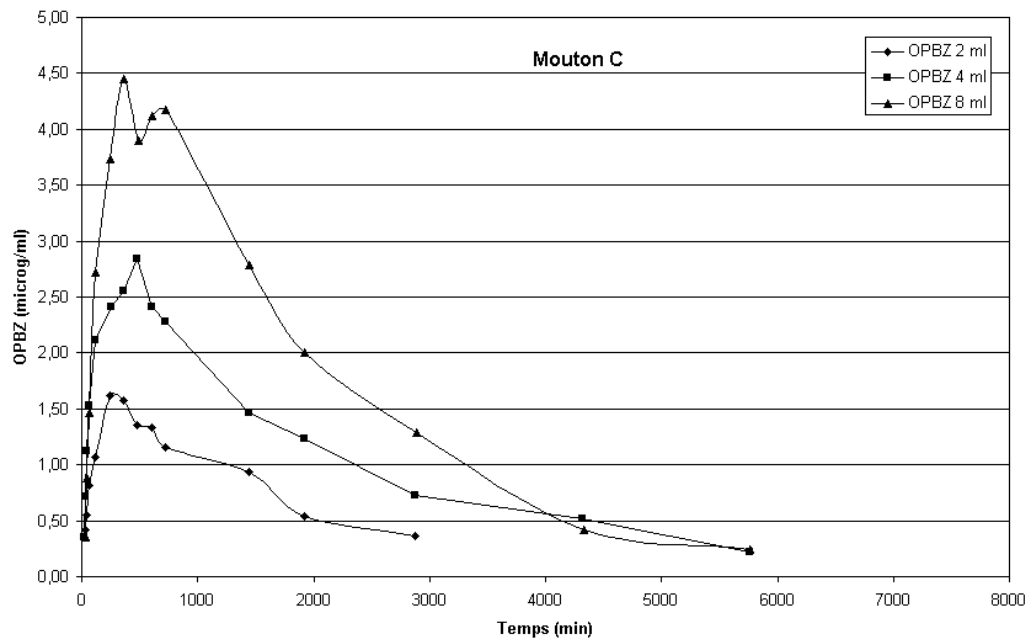


Figure 36 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis C.

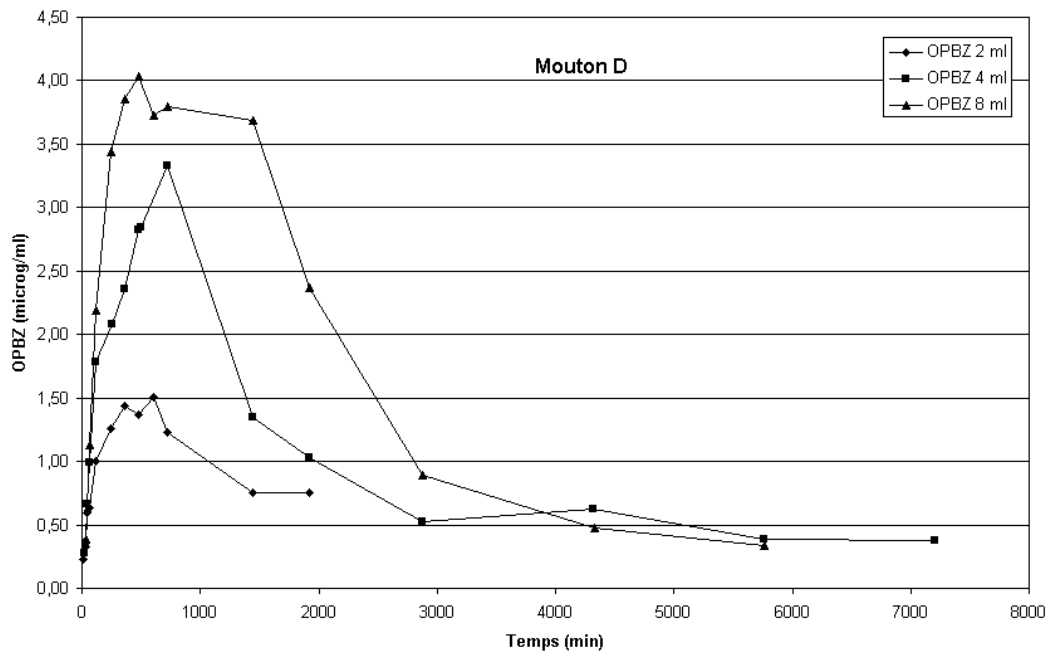


Figure 37 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis D.

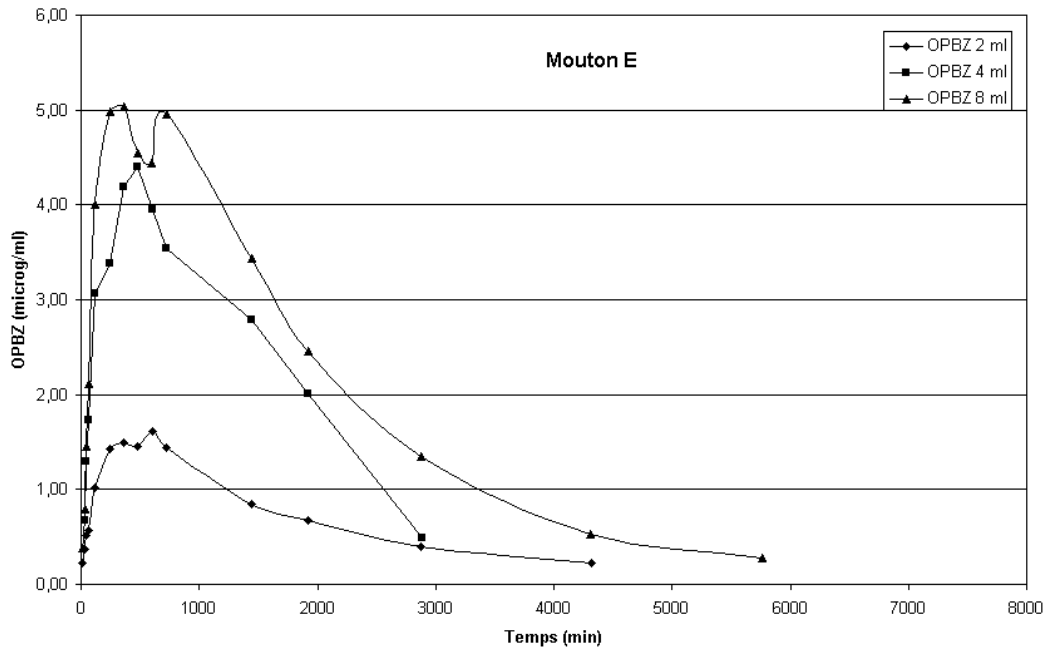


Figure 38 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis E.

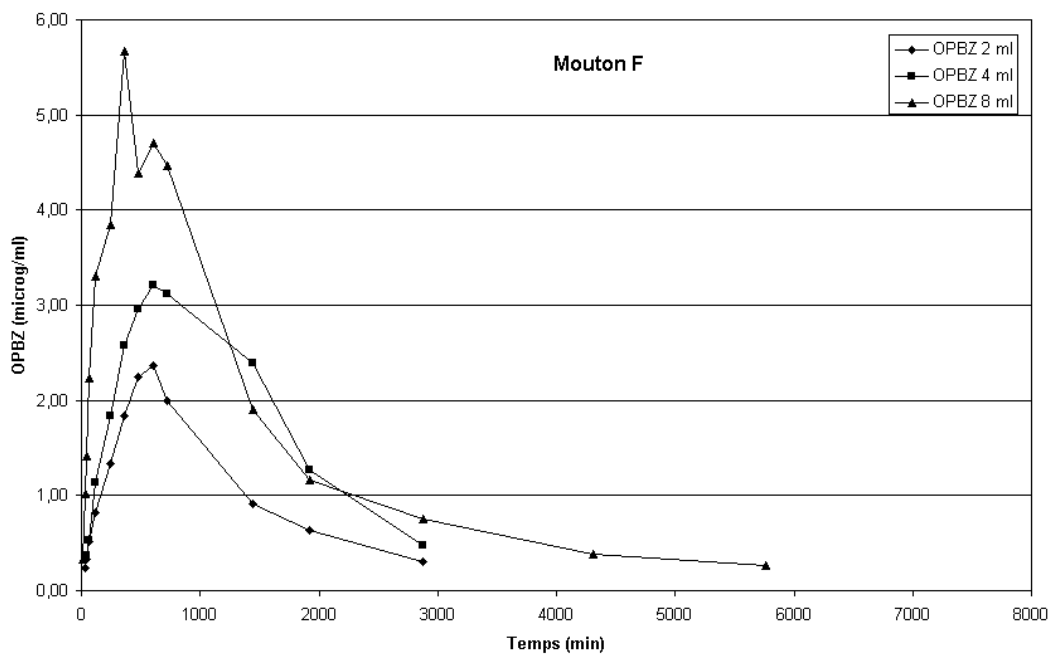


Figure 39 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis F.



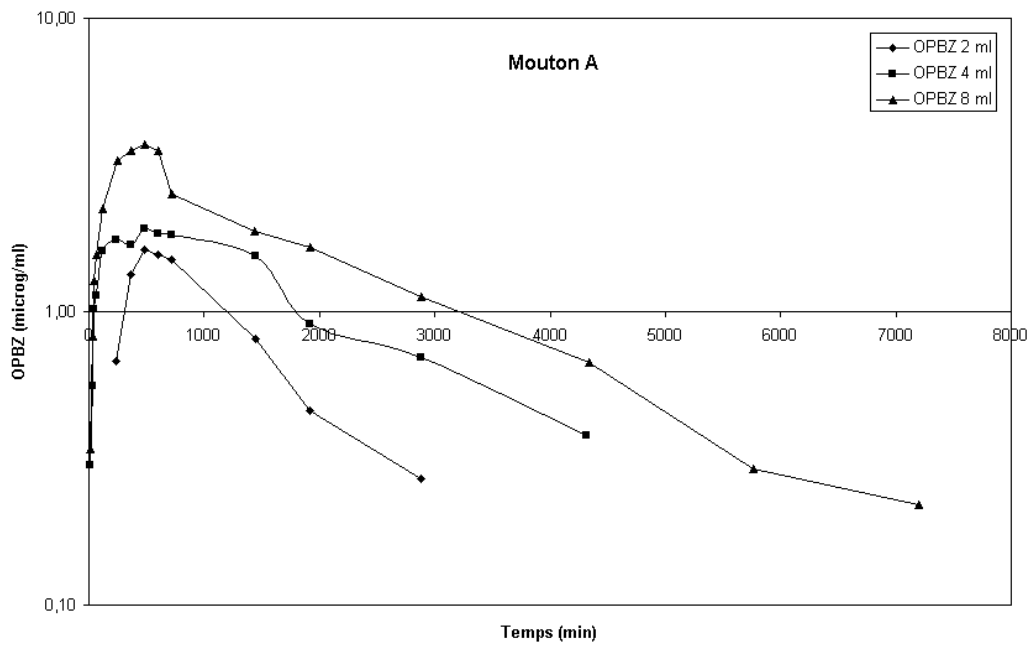


Figure 40 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis A (échelle semi-logarithmique).

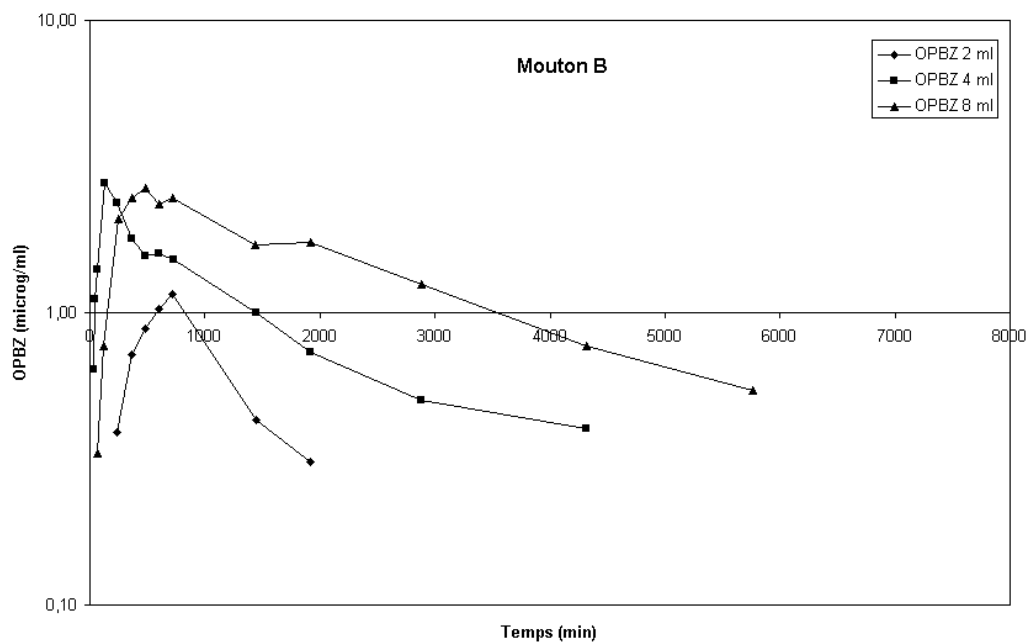


Figure 41 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis B (échelle semi-logarithmique).

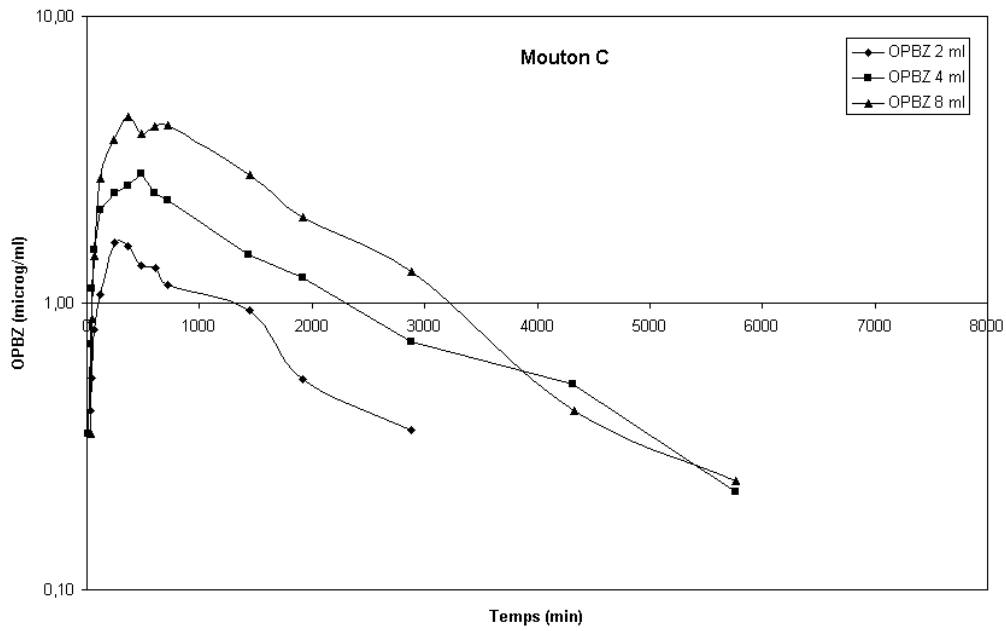


Figure 42 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis C (échelle semi-logarithmique).

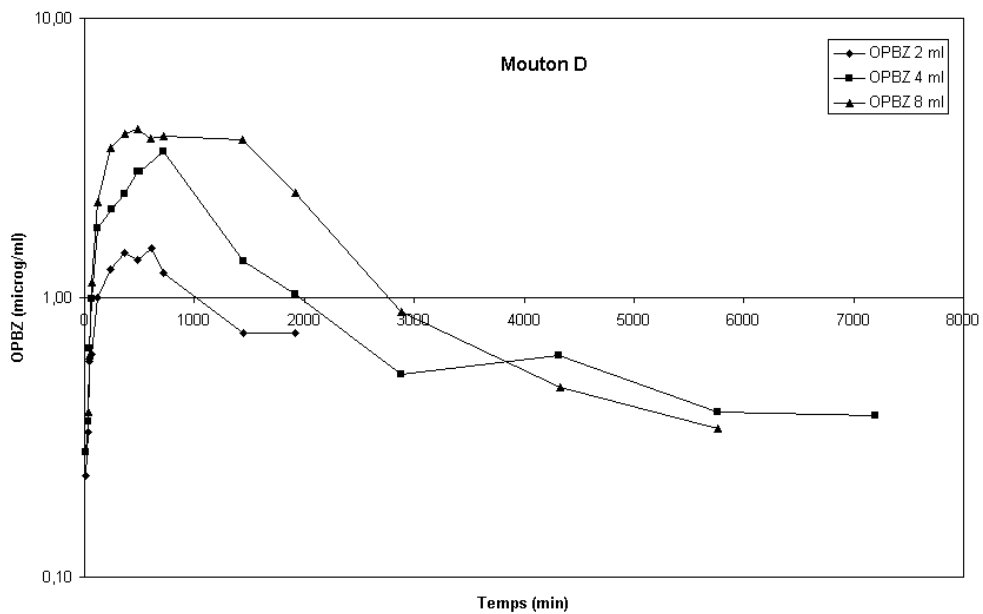


Figure 43 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis D (échelle semi-logarithmique).

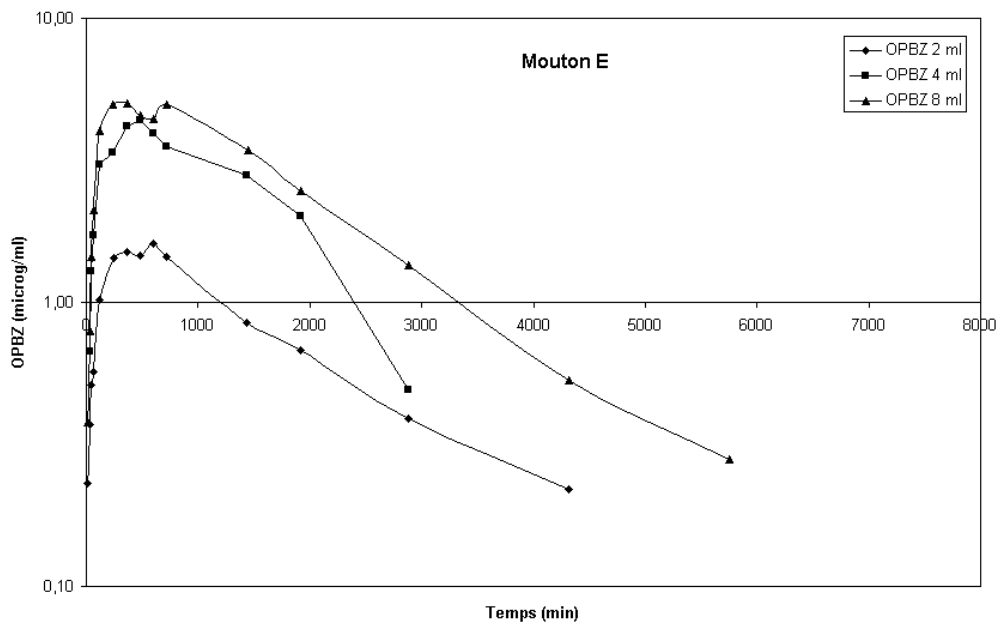


Figure 44 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis E (échelle semi-logarithmique).

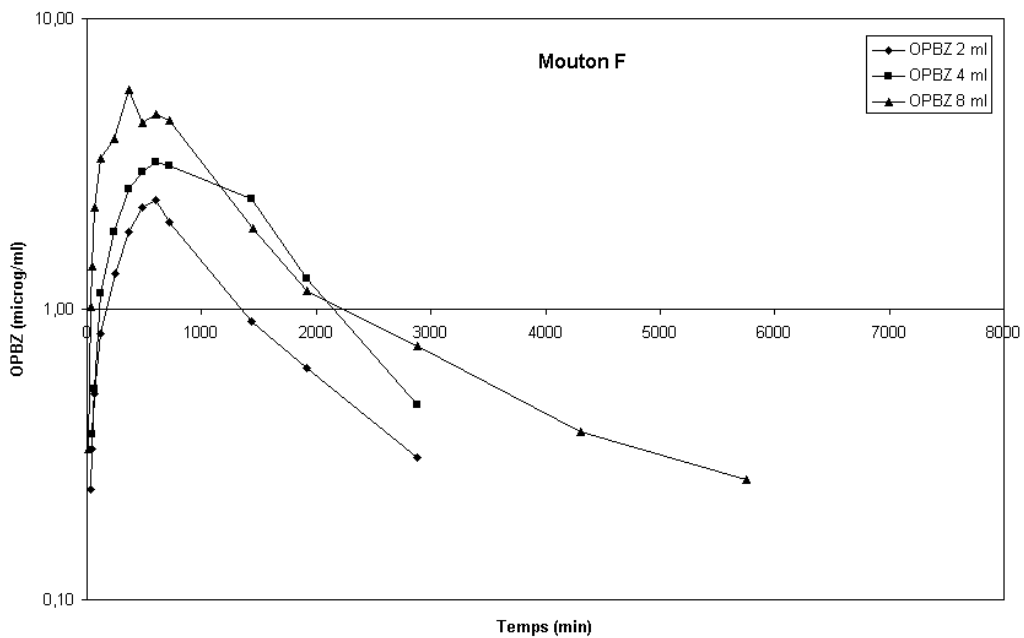


Figure 45 : Concentration plasmatique d'oxyphenbutazone en fonction du temps et du volume de phénylbutazone injecté par voie IM pour la brebis F (échelle semi-logarithmique).

## 8. Tableaux des mesures des concentrations plasmatiques de phénylbutazone et oxyphénylbutazone après injection IV de phénylbutazone

Tableau 15 : Valeurs des concentrations plasmatiques de phénylbutazone et oxyphénylbutazone après injection IV de phénylbutazone, pour les six brebis. nd : non detected, blq: below limit of quantification (0.25 µg/ml pour la phénylbutazone et 0.20 µg/ml pour l'oxyphénylbutazone) .

| Temps | Phénylbutazone |        |        |        |        |        | Oxyphénylbutazone |      |      |      |      |      |
|-------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------|------|------|------|------|------|
|       | A              | B      | C      | D      | E      | F      | A                 | B    | C    | D    | E    | F    |
| 0     | 0,00           | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | 0,00   | nd                | nd   | nd   | nd   | nd   | nd   |
| 2     | 151,84         | 146,21 | 151,15 | 165,54 | 130,22 | 141,07 | 0,51              | blq  | blq  | 0,58 | 0,70 | blq  |
| 5     | 138,57         | 126,69 | 126,52 | 144,05 | 114,02 | 124,21 | 0,64              | 0,58 | 0,65 | 1,35 | 1,42 | 0,74 |
| 10    | 121,01         | 112,03 | 117,31 | 128,23 | 104,46 | 112,49 | 1,05              | 0,90 | 1,04 | 1,81 | 2,11 | 1,06 |
| 20    | 109,81         | 96,07  | 108,28 | 109,50 | 84,65  | 92,26  | 1,23              | 1,43 | 1,44 | 2,10 | 2,33 | 1,46 |
| 30    | 96,62          | 89,61  | 98,86  | 101,64 | 81,26  | 92,04  | 1,39              | 1,62 | 1,93 | 2,41 | 2,65 | 1,79 |
| 60    | 88,81          | 78,76  | 90,43  | 88,40  | 67,50  | 77,53  | 1,58              | 1,93 | 2,18 | 2,59 | 2,83 | 2,07 |
| 120   | 75,12          | 69,73  | 75,15  | 75,92  | 56,44  | 64,82  | 1,89              | 2,04 | 2,54 | 2,84 | 2,80 | 2,29 |
| 240   | 69,23          | 60,17  | 65,56  | 62,66  | 47,29  | 52,21  | 2,09              | 1,82 | 2,74 | 3,42 | 2,74 | 2,38 |
| 360   | 63,21          | 53,83  | 66,34  | 55,25  | 41,25  | 49,47  | 2,06              | 1,89 | 2,60 | 3,27 | 2,82 | 2,37 |
| 480   | 56,40          | 44,80  | 56,18  | 50,41  | 37,02  | 45,64  | 2,15              | 1,75 | 2,37 | 2,94 | 1,95 | 1,95 |
| 600   | 51,43          | 39,19  | 52,67  | 47,12  | 32,31  | 42,18  | 1,93              | 1,56 | 2,12 | 2,50 | 1,66 | 1,60 |
| 1440  | 36,57          | 26,21  | 31,12  | 27,02  | 18,50  | 26,19  | 1,12              | 0,68 | 1,27 | 1,17 | 0,88 | 0,87 |
| 2880  | 16,61          | 11,18  | 12,42  | 12,35  | 6,87   | 11,84  | 0,61              | 0,42 | 0,54 | 0,60 | 0,37 | 0,43 |
| 4320  | 7,64           | 4,77   | 5,24   | 5,15   | 2,70   | 7,30   | 0,47              | 0,25 | blq  | 0,29 | nd   | blq  |

## 9. Courbes de concentration plasmatique en phénylbutazone et oxyphénylbutazone après injection IV de phénylbutazone.

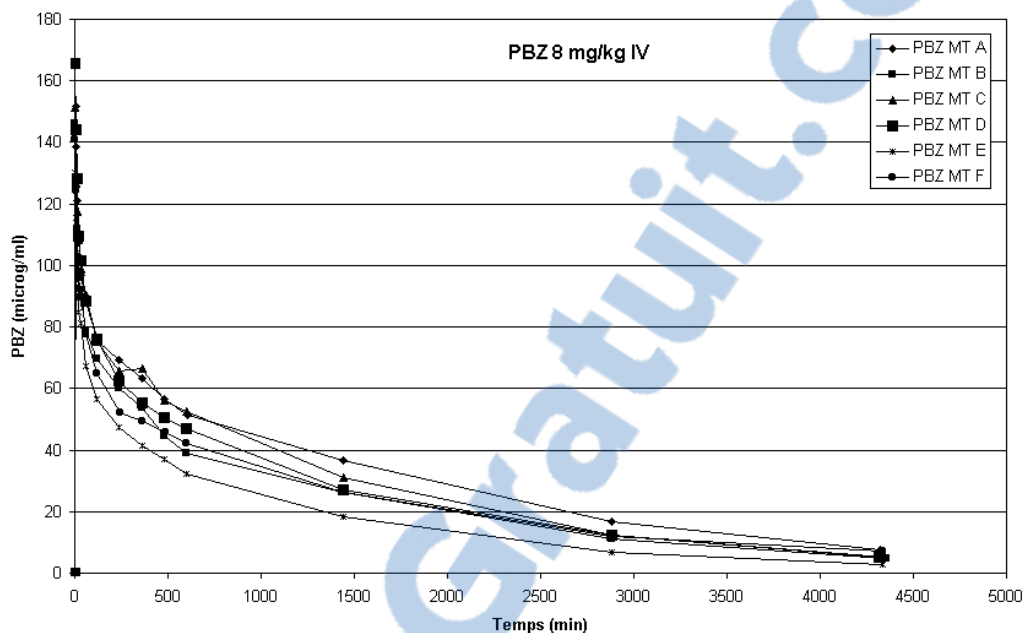


Figure 46 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps après injection IV à 8 mg/kg chez les six brebis.

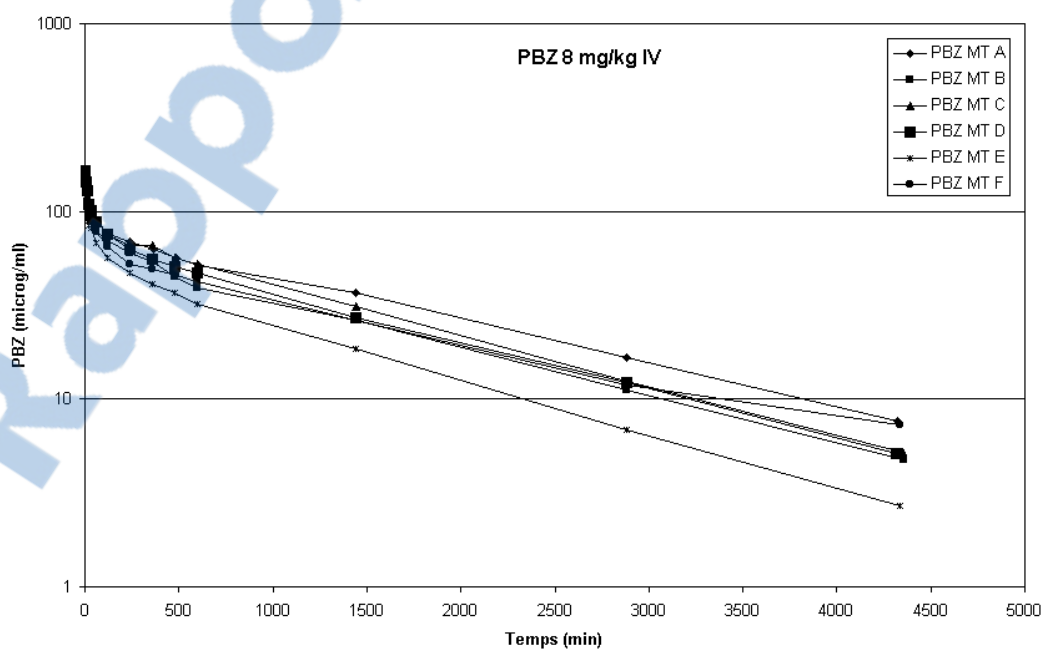


Figure 47 : Concentration plasmatique de phénylbutazone en fonction du temps après injection IV à 8 mg/kg chez les six brebis (échelle semi-logarithmique).

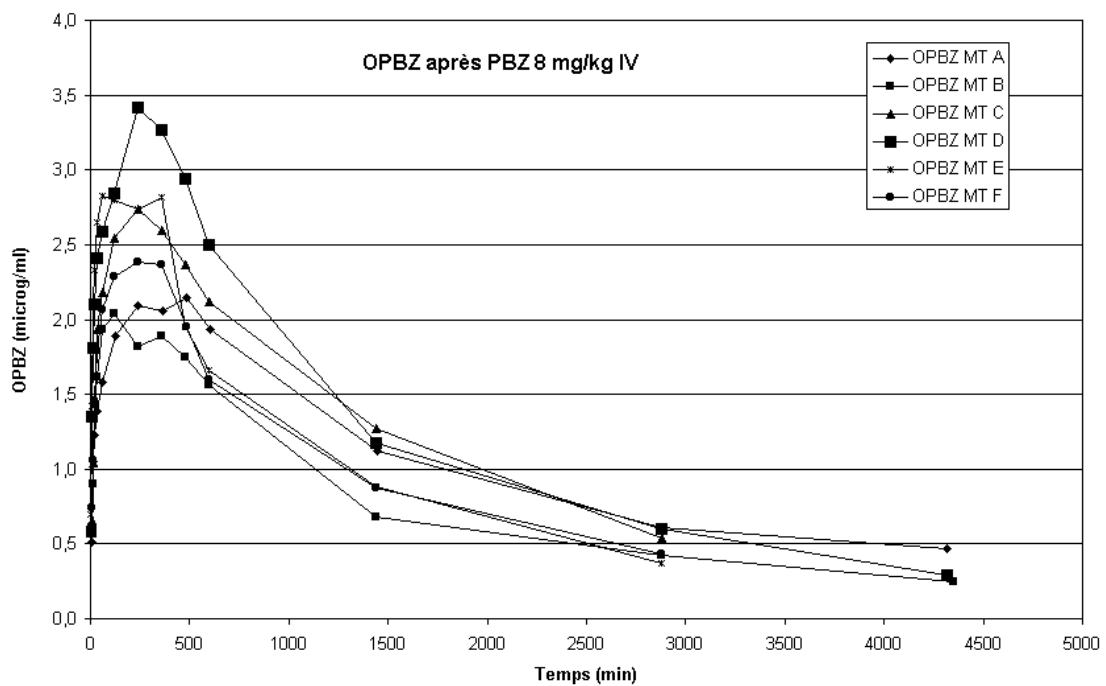


Figure 48 : Concentration plasmatique d'oxyphénylbutazone en fonction du temps après injection IV de phénylbutazone à 8 mg/kg chez les six brebis.

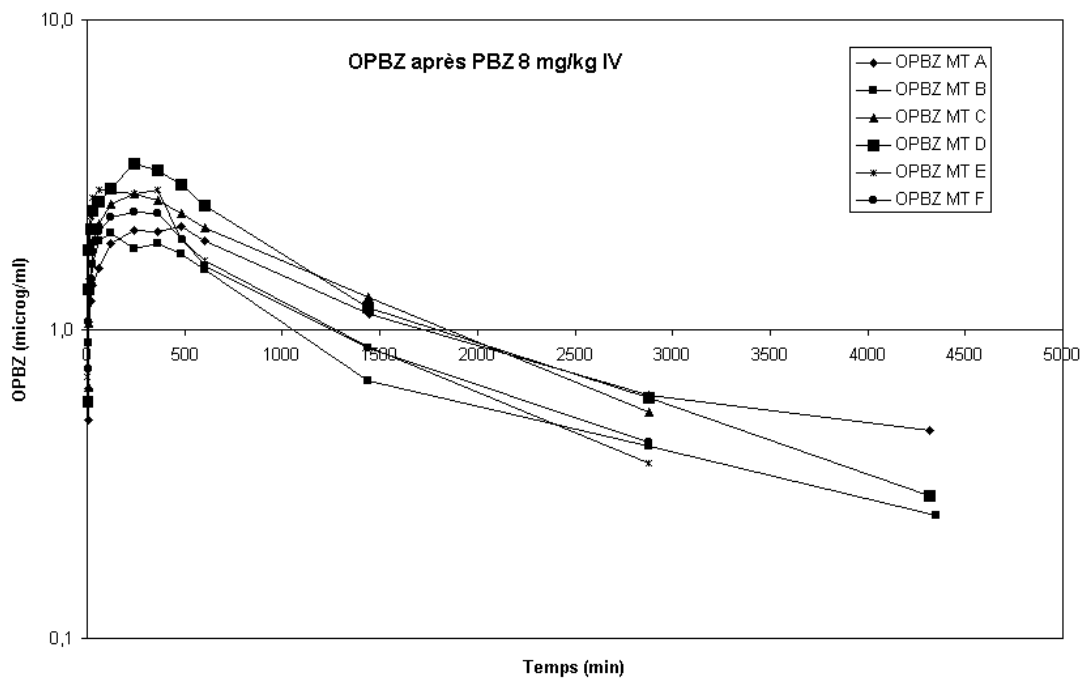


Figure 49 : Concentration plasmatique d'oxyphénylbutazone en fonction du temps après injection IV de phénylbutazone à 8 mg/kg chez les six brebis (échelle semi-logarithmique).

## 10. Représentation graphique de l'effet des transformations logarithmiques sur les variances des facteurs des modèles statistiques étudiés.

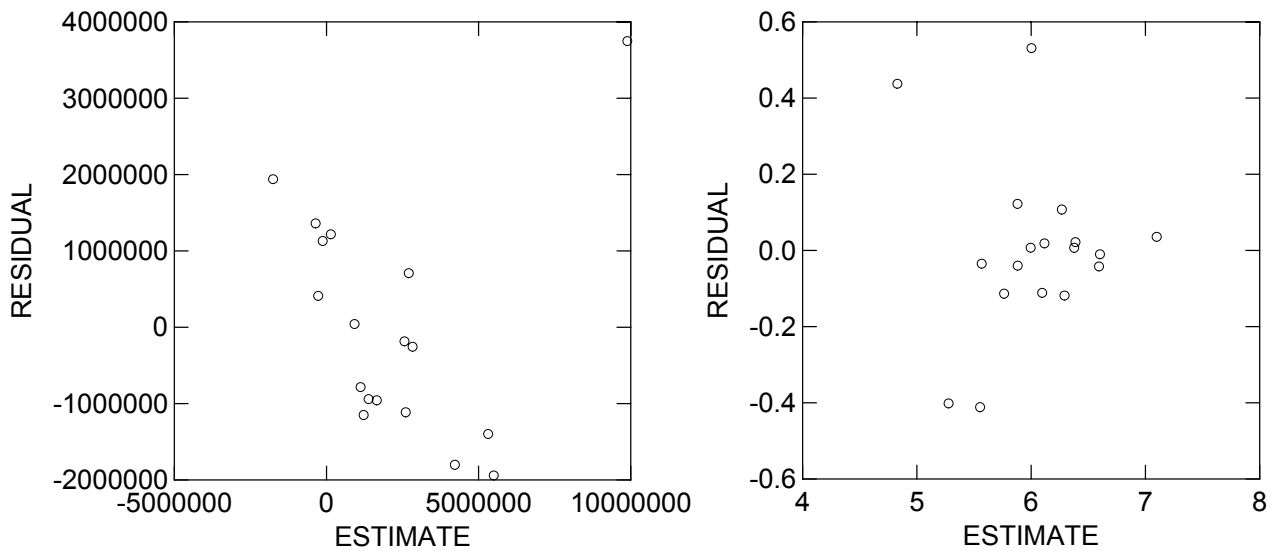


Figure 50 : Illustration de l'effet de la transformation logarithmique de l'AUC sur l'homogénéité des variances. Les graphiques représentent les résidus du modèle statistique en fonction des estimateurs. A gauche pour l'AUC, à droite pour le logarithme de l'AUC.

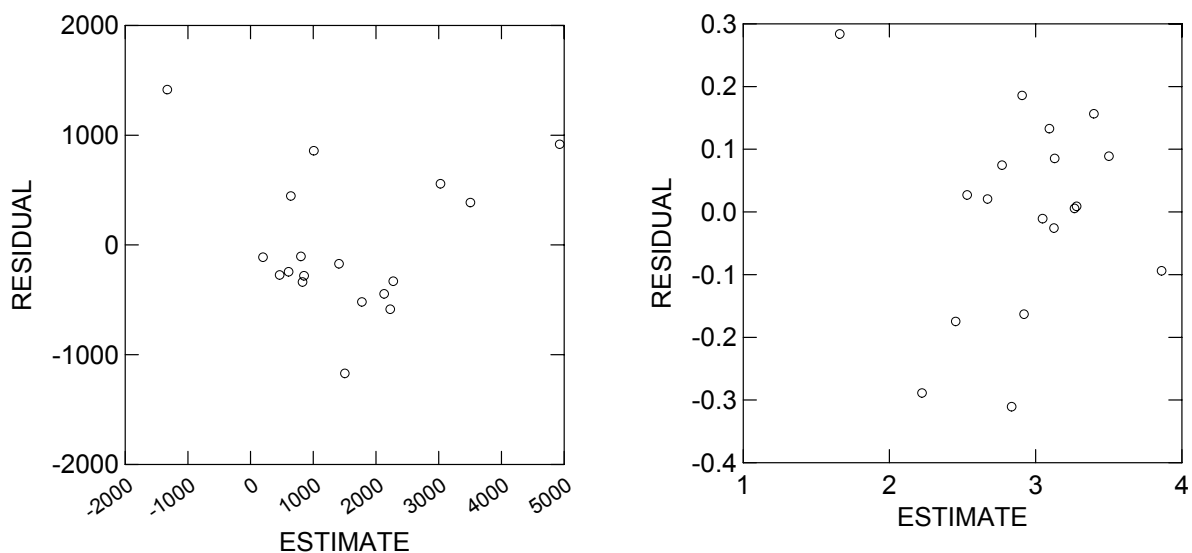


Figure 51 : Illustration de l'effet de la transformation logarithmique du Cmax sur l'homogénéité des variances. Les graphiques représentent les résidus du modèle statistique en fonction des estimateurs. A gauche pour le Cmax, à droite pour le logarithme du Cmax.

# TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| PLAN.....  | 1  |
| INTRODUCTION.....  | 3  |
| 1- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....   | 6  |
| 1.1 – LE PROBLÈME DES INJECTIONS INTRAMUSCULAIRES.....   | 6  |
| 1.1.1 – AVANTAGES DES INJECTIONS INTRAMUSCULAIRES...6  |    |
| 1.1.2 – INCONVENIENTS DES INJECTIONS<br>INTRAMUSCULAIRES.....                                    | 6  |
| 1.1.3 – FACTEURS RESPONSABLES DES LÉSIONS.....   | 7  |
| 1.1.3.1 – La formulation.....  | 7  |
| 1.1.3.2 – Les paramètres physicochimiques.....   | 8  |
| 1.1.3.3 – Le matériel et les méthodes d’injection.....   | 8  |
| 1.2 – LES DIFFÉRENTES MÉTHODES D’ÉVALUATION DES LÉSIONS<br>MUSCULAIRES AU POINT D’INJECTION..... | 9  |
| 1.2.1 – LES MÉTHODES INVASIVES.....  | 9  |
| 1.2.1.1 – L’examen anatomopathologique.....  | 9  |
| 1.2.1.2 – Étude sur muscle isolé.....  | 10 |
| 1.2.2 – LES MÉTHODES NON INVASIVES.....  | 12 |
| 1.2.2.1 – Imagerie.....  | 12 |
| 1.2.2.2 – Marqueurs biochimiques.....  | 12 |
| 1.3 – LA CREATINE KINASE COMME MARQUEUR CELLULAIRE.....  | 13 |
| 1.3.1- RAPPELS BIOCHIMIQUES.....   | 13 |
| 1.3.1.1- Structure de la Créatine Kinase.....  | 13 |
| 1.3.1.2- Rôle physiologique .....  | 14 |
| 1.3.2 – MÉTHODES DE DOSAGE DE LA CRÉATINE KINASE<br>PLASMATIQUE.....                             | 17 |
| 1.3.3 – PARAMÈTRES PHARMACOCINÉTIQUES DE LA<br>CRÉATINE KINASE.....                              | 17 |



|   |    |
|---|----|
| 1.3.4 – STABILITE DE LA CRÉATINE KINASE PRELEVEE<br>.....                 | 18 |
| 1.4 – LA PHENYLBUTAZONE.....  | 22 |
| 1.4.1 – GENERALITES.....  | 22 |
| 1.4.2 – PHARMACOLOGIE DE LA PHENYLBUTAZONE.....                           | 22 |
| 1.4.3 – METHODES DE DOSAGE DE LA PHENYLBUTAZONE...22                      |    |
| 2 – OBJECTIFS.....  | 23 |
| 3 – MATERIELS ET METHODES.....  | 24 |
| 3.1 – PLAN EXPERIMENTAL.....  | 24 |
| 3.2 – LES ANIMAUX ET LEUR ENTRETIEN.....                                  | 24 |
| 3.3 – LA SUBSTANCE TEST.....  | 25 |
| 3.4 – PRELEVEMENTS.....   | 27 |
| 3.5 – DOSAGES.....  | 28 |
| 3.6 – METHODES PHARMACOCINETIQUES.....                                    | 29 |
| 3.7 – CALCUL DE LA MASSE DE MUSCLE LESE.....                              | 30 |
| 3.8 – METHODES STATISTIQUES.....  | 31 |
| 4 – RESULTATS.....  | 32 |
| 4.1 – PROFIL PLASMATIQUE DE LA CREATINE KINASE.....                       | 32 |
| 4.2 – CINETIQUE PLASMATIQUE DE LA PHENYLBUTAZONE.....                     | 32 |
| 4.3 – PHARMACOCINETIQUE DE L’OXYPHENYLBUTAZONE.....                       | 35 |
| 4.4 – ETUDE DE L’EFFET VOLUME SUR LES VALEURS DES AUC ET<br>DU CMAX ..... | 35 |
| 4.5 – QUANTIFICATION DES LESIONS MUSCULAIRES.....                         | 35 |
| 5 – DISCUSSION.....   | 40 |
| CONCLUSION.....   | 44 |
| BIBLIOGRAPHIE .....   | 45 |
| LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....  | 50 |

|   |    |
|---|----|
| ANNEXES.....  | 53 |
| 1 – TABLEAU DES RESULTATS DES MESURES DE CREATINE<br>KINASE PLASMATIQUE.....  | 53 |
| 2 – COURBES DE L’ACTIVITE PLASMATIQUE DE LA CRÉATINE<br>KINASE EN FONCTION DU TEMPS .....   | 55 |
| 3 – DOSES INDIVIDUELLES DE PHENYLBUTAZONE RECUES EN IM<br>ET EN IV.....   | 61 |
| 4 – TABLEAU DE RESULTAS DES DOSES DE PHENYLBUTAZONE<br>RECUES.....  | 62 |
| 5 – COURBES DE CONCENTRATION PLASMATIQUE DE<br>PHENYLBUTAZONE EN FONCTION DU TEMPS.....   | 63 |
| 6 – TABLEAUX DE RESULTATS DES MESURES<br>D’OXYPHENYLBUTAZONE.....   | 69 |
| 7 – COURBES DE CONCENTRATION PLASMATIQUE D’<br>OXYPHENYLBUTAZONE EN FONCTION DU TEMPS.....  | 70 |
| 8 – TABLEAUX DE MESURE DES CONCENTRATIONS<br>PLASMATIQUES DE PHENYLBUTAZONE ET<br>D’OXYPHENBUTAZONE APRES INJECTION IV DE<br>PHENYLBUTAZONE.....          | 76 |
| 9 – COURBES DE CONCENTRATION PLASMATIQUE EN<br>PHENYLBUTAZONE ET OXYPHENBUTAZONE APRES<br>INJECTION IV DE PHENYLBUTAZONE.....                             | 77 |
| 10 – REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L’EFFET DES<br>TRANSFORMATIONS LOGARITHMIQUES SUR LES<br>VARIANCES DES FACTEURS DES MODELES STATISTIQUES<br>ETUDIES..... | 79 |
| TABLE DES MATIERES.....   | 80 |

Toulouse, 2002

NOM : CAZAUX

PRENOM : Jérôme

TITRE : ETUDE DE L'EFFET DE DIFFERENTS VOLUMES D'UNE SOLUTION DE PHENYLBUTAZONE ADMINISTREE PAR VOIE INTRAMUSCULAIRE SUR LA LESION INDUITE AU POINT D'INJECTION CHEZ LA BREBIS.

RESUME : Une méthode non invasive d'évaluation des lésions musculaires iatrogènes consécutives à l'administration intramusculaire de médicaments a été proposée en déterminant la quantité (Q) de créatine kinase (CK) libérée à partir du muscle lésé, en utilisant une équation du type  $Q=a \times AUC$ , AUC étant l'aire sous la courbe de la CK plasmatique en fonction du temps et a une constante (Lefebvre H., 1994). Cette proposition a été validée expérimentalement par Ferré et coll., 2001. La brebis est un modèle intéressant pour l'étude cinétique de la CK à cause de la stabilité de l'activité CK plasmatique au repos et des facilités de manipulation. La phénylbutazone, un anti-inflammatoire non stéroïdien, a déjà été utilisée chez cette espèce pour les études de tolérance (Houpert P. et coll., 1995) et sera retenue comme substance test dans cette étude. Nous nous sommes proposés d'étudier l'effet du volume sur les paramètres pharmacocinétiques de la créatine kinase donc sur les lésions musculaires. Le volume a un effet significatif sur le Cmax ( $P = 0.011$ ) et sur le logarithme de l'AUC ( $P = 0.027$ ) mais pas sur l'AUC directement, à cause de trop grandes variations dues au nombre restreint de sujets. La quantité de muscle lésé augmente aussi avec le volume, avec un coefficient de corrélation linéaire de 0.9897 :  $0.511 \pm 0.5328$  g/kg PV pour 2 ml,  $1.084 \pm 0.8926$  g/kg PV pour 4 ml et  $2.540 \pm 3.0315$  g/kg PV pour 8 ml.

MOTS-CLES : CREATINE KINASE, INJECTION INTRAMUSCULAIRE, LESION, MUSCLE, TOLERANCE, VOLUME, PHENYLBUTAZONE, MOUTON, BREBIS, OVIN.

---

ENGLISH TITLE: STUDY OF DIFFERENT VOLUMES EFFECT OF PHENYLBUTAZONE SOLUTION ADMINISTERED INTRAMUSCULARLY ON POSTINJECTION MUSCLE DAMAGE IN SHEEP.

ABSTRACT: A noninvasive method for the quantitative evaluation of postinjection muscle damage has been proposed by determination of released creatine kinase (CK) quantity (Q) from the damaged muscle, with an equation like  $Q=a \times AUC$ . (AUC) is the area under the CK plasma activity curve and (a) is a constant (Lefebvre H., 1994). This method has been experimentally validated by Ferré et al., 2001. Ewe is an interesting model for CK pharmacokinetic studies because of the plasma CK activity stability and the easiness for handling. Phenylbutazone has been already used for tolerance studies (Houpert P. et al., 1995) and so has been chosen. We decided to study the effect of the injection volume on CK pharmacokinetic parameters, so on muscle damage. The volume effect is significant for Cmax (maximal concentration of CK activity) with a p-value equal to 0.011, and for  $\log(AUC)$  (p-value = 0.027) but not for AUC, because of the too large variations due to the small subjects number. The quantity of damaged muscle increase too with volume (coefficient of linear correlation equal to 0.9897) :  $0.511 \pm 0.5328$  g/kg for 2 ml,  $1.084 \pm 0.8926$  g/kg for 4 ml and  $2.540 \pm 3.0315$  g/kg for 8 ml.

KEY WORDS: CREATINE KINASE, INTRAMUSCULAR INJECTION, LESION, MUSCLE, TOLERANCE, VOLUME, PHENYLBUTAZONE, SHEEP.