

SOMMAIRE

Table des Abréviations.....	5
Table des Illustrations	7
INTRODUCTION	11
 Première partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SELAMECTINE	19
1.1. La naissance des endectocides	19
1.2. Structure chimique de la sélamectine.....	25
1.3. Action biologique de la sélamectine	33
 II. ACTION IN VIVO DE LA SELAMECTINE	 39
2.1. Prévention et traitement de la pulicose	43
2.2. Traitement de la gale sarcoptique.....	45
2.3. Traitement de la phtiriose à <i>Trichodectes canis</i>	47
2.4. Traitement des ascaridoses à <i>Toxocara canis</i>	47
2.5. Prévention de la dirofilariose	51
2.6. Utilisation spécifique de la sélamectine chez le chat.....	53
2.7. Modalités d'utilisation de la sélamectine en formulation tubes (Stronghold®)....	55
2.8. Influence du sexe de l'animal sur l'utilisation de la sélamectine	57

Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES	61
1.1. Phase animale.....	61
1.2. Phase analytique : généralités.....	61
1.2.1. L'extraction et la purification de la molécule.....	63
1.2.2. L'évaporation et la dérivatisation du produit extrait.....	65
1.2.3. La chromatographie liquide haute performance.....	67
1.2.4. Intérêts de la phase analytique.....	70
1.3. Pharmacocinétique : théorie et définition.....	75
1.3.1. Principe d'obtention des paramètres pharmacocinétiques.....	75
1.3.2. Modélisation pharmacocinétique.....	77
1.4. Phase analytique : dosage des échantillons.....	83
1.4.1. Réalisation de la gamme étalon.....	83
1.4.2. Dosage des échantillons.....	85
1.4.3. Validation de la méthode.....	87
II. RESULTATS	89
2.1. Résultats de l'étude pharmacocinétique.....	89
2.2. Paramètres pharmacocinétiques chez les chiens mâles et femelles.....	99
III. DISCUSSION	103
3.1. Pertinence du choix de la concentration plasmatique.....	103
3.2. Intérêts et perspectives de l'étude de l'influence du sexe de l'animal sur la pharmacocinétique de la selamectine.....	107
3.3. Conclusion.....	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111
ANNEXES	123

* Article issu du présent travail : Dupuy J, Derlon AL, Sutra JF, Cadiergues MC, Franc M, Alvinerie M. Pharmacokinetics of selamectin in dogs after topical application. *Vet Res Commun.* 2004 Jul ;28(5) :407-13.

* Principe du test de Student

* Table de Student

* Précisions intra- et inter-journalières des dosages des échantillons plasmatiques

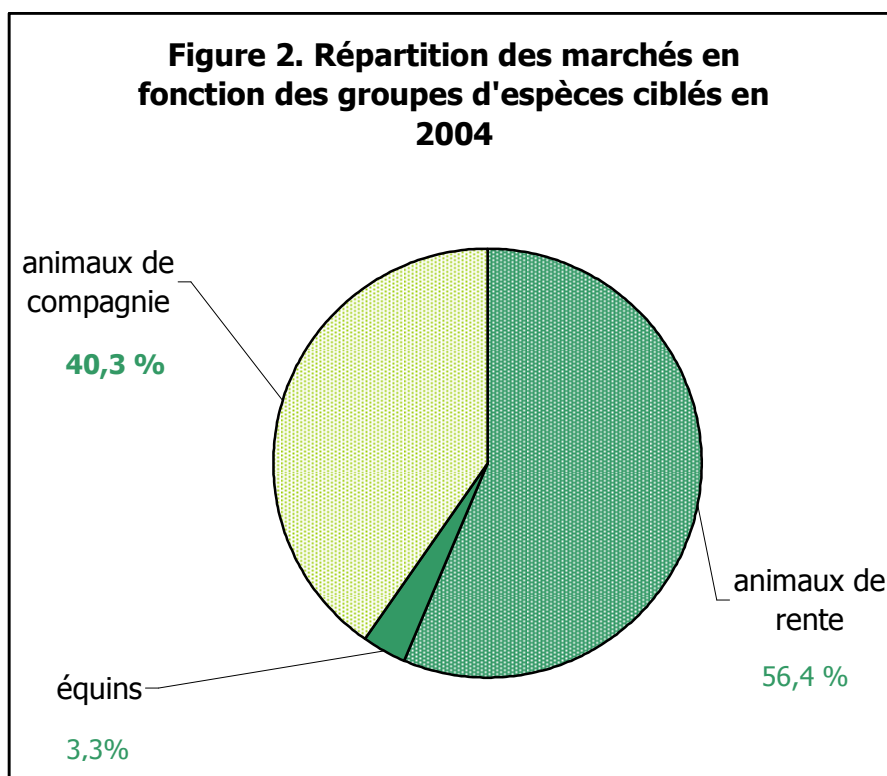
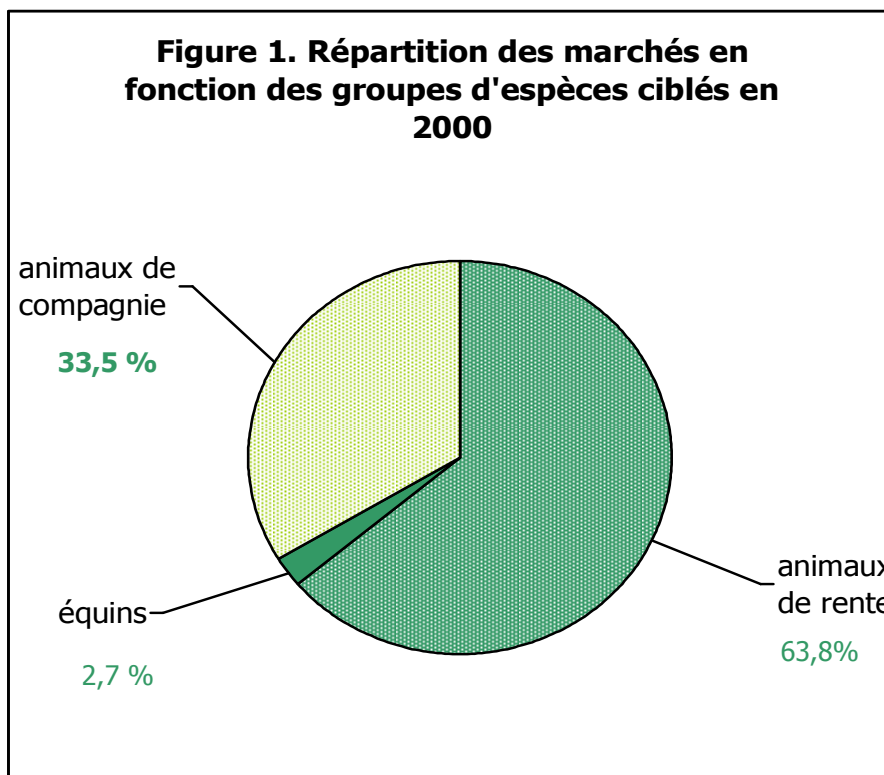
TABLE DES ABREVIATIONS

ACN.....	Acétonitrile
AMM.....	Autorisation de mise sur le marché
AUC.....	Aire sous la courbe (Area Under the Curve)
BV.....	Bovin
C_{max}	Concentration maximale
CN.....	Chien
CT.....	Chat
DMV.....	Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires
EDTA.....	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
HPLC.....	High Performance Liquid Chromatography
IT.....	Indice thérapeutique
IV.....	Intraveineux
MeOH.....	Méthanol
MRT.....	Temps moyen de résidence (Mean Residence Time)
QSP.....	Quantité suffisante pour
SC.....	Sous-cutané
SPE.....	Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction)
Std _i	Standard interne
T_{max}	Temps maximal

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Répartition des marchés en fonction des groupes d'espèces ciblées en 2000	10
Figure 2. Répartition des marchés en fonction des groupes d'espèces ciblées en 2004	10
Figure 3. Répartition des marchés des différents produits de santé animale en 2000	12
Figure 4. Répartition des marchés des différents produits de santé animale en 2004	12
Tableau 1. Classification et historique des principaux benzimidazoles	18
Tableau 2. Classification et historique des principaux endectocides.....	20
Tableau 3. Différences majeures des structures chimiques entre plusieurs avermectines et milbémycines.....	26
Figure 5. Comparaison de la structure chimique des avermectines et des milbémycines.....	28
Figure 6. Structure chimique de la sélamectine	30
Figure 7. Structure chimique de la doramectine.....	30
Tableau 4. Action des anthelminthiques sur des cibles biochimiques.....	32
Figure 8. Action de la sélamectine sur les canaux ioniques des cellules nerveuses et musculaires des parasites ciblés.....	34
Figure 9. Rôle de la glycoprotéine P au niveau de la barrière hémato-méningée : expulsion de molécules vers le sang.....	35
Figure 10. Implication de la P-gp dans la pharmacocinétique des endectocides	36
Figure 11. Cycle de développement de <i>Ctenocephalides</i> spp, agent de pulicose	42
Figure 12. Cycle de développement de <i>Sarcoptes scabiei</i> , agent de gale.....	44
Figure 13. Cycle de développement de <i>Trichodectes canis</i> , un pou broyeur.....	46
Figure 14. Cycle de développement de <i>Toxocara canis</i>	48
Figure 15. Cycle de développement de <i>Dirofilaria immitis</i>	50
Tableau 5. Différentes présentations « spot-on » du Stronghold®	54
Tableau 6. Caractéristiques des animaux intégrés à l'expérimentation	60

Tableau 7. Calendrier des prélèvements sanguins sur les 10 animaux listés dans le tableau 6.....	60
Figure 16. Schéma général de la phase analytique	62
Figure 17. Schéma d'un appareil à chromatographie en phase liquide (HPLC)	66
Figure 18. Schéma de principe de l'HPLC	66
Figure 19. Profil plasmatique schématique de la sélamectine chez le chien, obtenu par HPLC	74
Tableau 10. Solutions mères et gamme d'étalonnage utilisées.....	82
Figure 20. Schéma théorique d'un suivi pharmacocinétique de la concentration plasmatique d'un principe actif après une administration IV ou cutanée (spot-on)	86
Figure 21. Modèle de tableau utilisé pour le recueil des résultats au cours de la cinétique plasmatique de la sélamectine chez chaque animal.....	88
Tableau 11. Tableau récapitulatif des concentrations de sélamectine (en ng/mL) de tous les échantillons de chaque chien femelle	90
Figure 22. Courbes des cinétiques plasmatiques de la sélamectine chez les chiens femelles (de J ₀ à J ₃₅).....	91
Tableau 12. Tableau récapitulatif des concentrations de sélamectine (en ng/mL) de tous les échantillons de chaque chien mâle.....	92
Figure 23. Courbes des cinétiques plasmatiques de la sélamectine chez les chiens mâles (de J ₀ à J ₃₅)	93
Figure 24. Courbes moyennes des cinétiques de la sélamectine chez les mâles et les femelles de l'étude.....	94
Tableau 13. Concentrations moyennes en sélamectine chez les 5 femelles et représentation graphique des résultats.....	96
Tableau 14. Concentrations moyennes en sélamectine chez les 5 mâles et représentation graphique des résultats.....	97
Tableau 15. Paramètres pharmacocinétiques calculés chez les 10 animaux	98
Tableau 16. Comparaison des paramètres pharmacocinétiques moyens chez les 10 animaux	100
Figure 25. Profils des concentrations en moxidectine dans plusieurs tissus chez des bovins après une administration sous-cutanée	102
Figure 26. Profils plasmatiques schématiques de 3 endectocides chez des bovins après une administration sous-cutanée.....	104



* Le Syndicat de l'Industrie du Médicament Vétérinaire et Réactifs (SIMV) a été créé il y a plus de 20 ans pour représenter les laboratoires responsables de la mise sur le marché français des médicaments destinés aux animaux de compagnie et d'élevage. 31 sociétés (26 dans le médicament : par exemple Pfizer, Merial, Virbac... et 5 réactifs : par exemple IDEXX, Bio Veto Test...) représentant plus de 95% du marché français (estimé à 866,6 millions d'euros) en sont membres.

INTRODUCTION

Place des antiparasitaires dans l'évolution récente des produits de santé animale

Le marché des produits de santé animale couvre surtout le secteur des animaux de rente qui représentait à lui seul quasiment les deux tiers des ventes des laboratoires en 2000 (Figures 1 et 2).

Ces dernières années, l'essor du secteur des produits de santé animale destinés aux animaux de compagnie (+ 6,8% en 2004 par rapport à 2000) s'est fait au détriment du secteur des produits destinés aux animaux de rente. Dans ce paysage en évolution, les antiparasitaires tiennent une place importante (environ 25%) et plutôt stable (Figures 3 et 4).

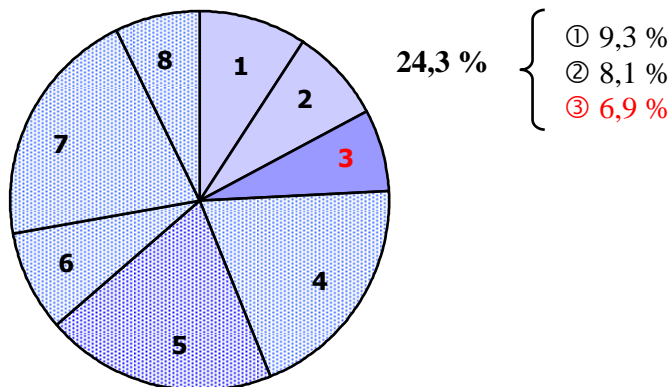
Choix des antiparasitaires

Le choix des principes actifs des produits antiparasitaires repose sur leur efficacité, leur innocuité et leur coût.

Les antiparasitaires doivent être efficaces contre tous les stades du parasite ciblé, ne pas être toxiques pour l'animal traité, être rapidement éliminés par l'hôte et être facilement administrables.

En pratique, sur un plan thérapeutique, les antiparasitaires doivent au minimum être actifs sur les stades pathogènes (les signes cliniques vont régresser dès l'élimination de ces derniers) à défaut de l'être sur tous les stades de développement du parasite ciblé. Afin d'éviter le développement de résistances, le plan prophylactique reposera ainsi sur une bonne gestion des moyens de lutte.

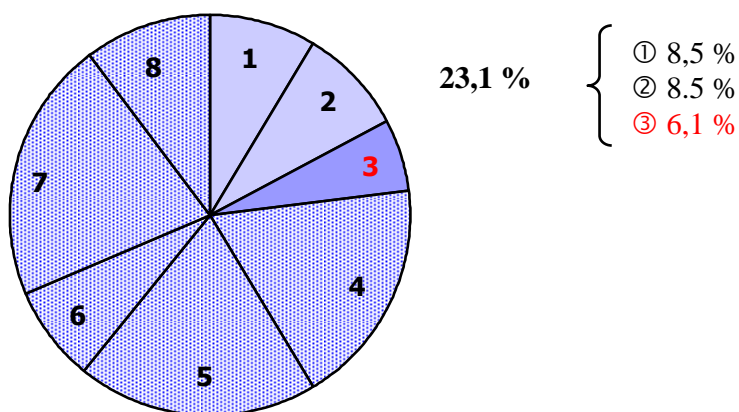
Figure 3. Répartition des marchés des différents produits de santé animale en 2000



- | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| □ 1- Anti-parasitaires internes | □ 2- Insecticides/ectoparasitocides |
| ■ 3- Endectocides | □ 4- Anti-infectieux |
| ■ 5- Vaccins | ■ 6- Produits topiques |
| ■ 7- Autres classes | ■ 8- Petfood |

d'après chiffres de www.simv.org *

Figure 4. Répartition des marchés des différents produits de santé animale en 2004



- | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| □ 1- Anti-parasitaires internes | □ 2- Insecticides/ectoparasitocides |
| ■ 3- Endectocides | ■ 4- Anti-infectieux |
| ■ 5- Vaccins | ■ 6- Produits topiques |
| ■ 7- Autres classes | ■ 8- Petfood |

d'après chiffres de www.simv.org *

Evolution des antiparasitaires

La recherche de molécules de plus en plus polyvalentes a abouti à la mise sur le marché de produits "révolutionnaires". Non seulement actifs sur les endoparasites, ils agissent également sur les parasites externes (ectoparasites) d'où leur appellation d'endectocides.

Chimiquement, ces macrolides antiparasitaires sont des lactones macrocycliques et on attribue un intérêt supplémentaire à leur utilisation : ils présentent une certaine rémanence dans l'organisme traité.

Les avermectines (ivermectine, doramectine, abamectine, éprinomectine) et les milbémycines (milbémycine oxime, moxidectine) sont les deux familles commercialisées en France.

Les endectocides ont rapidement vu leur utilisation généralisée aux animaux de compagnie avec notamment, un traitement efficace des larves de *Dirofilaria immitis* chez le chien. Cependant, la nécessité de prescrire des doses plus fortes sur les ectoparasites, a augmenté la toxicité générale de ces molécules. Un second inconvénient est lié à l'existence d'une hypersensibilité chez les chiens de race *Colley* à l'ivermectine, chef de file de ces molécules.

Il est important de noter qu'à ce jour la sélamectine, objet de nos travaux de thèse, est le premier des endectocides destiné aux animaux de compagnie combinant une activité nématodicide et ectoparasiticide à des doses permettant une utilisation plus sécurisée. De plus, la sélamectine ne semble pas être sujette au problème précédemment décrit d'hypersensibilité chez le *Colley*.

Pharmacocinétique des antiparasitaires

En 2000, Hennessy [18] exprime son inquiétude quant à l'absence probable de découverte d'un nouvel antiparasitaire dans un proche avenir. Le message qu'il convient alors de faire passer dès aujourd'hui, tant aux prescripteurs qu'aux utilisateurs, est la nécessité d'une administration plus raisonnée des produits antiparasitaires existant déjà.

Pour cela, il est nécessaire de :

- (i) mieux connaître la physiologie et la biologie du parasite,
- (ii) tenir compte de la nature de l'espèce cible (en évitant notamment les transpositions trop hâtives de schéma thérapeutique d'une espèce à une autre, souvent responsables de mauvais dosages...),
- (iii) respecter la posologie, le rythme et la durée de traitement.

Cependant, même si la probabilité de découvrir prochainement un nouveau composé antiparasitaire est faible, les laboratoires peuvent tout de même innover en explorant la pharmacocinétique des produits, et en proposant des formulations alternatives. Les objectifs de ces nouvelles formulations sont par exemple l'augmentation de la biodisponibilité du produit, le maintien d'une concentration active, l'ajustement des doses administrées...

La pharmacocinétique permet de décrire de façon qualitative et quantitative les processus (i) d'absorption, (ii) de distribution, (iii) de métabolisation et (iv) d'élimination d'un principe actif ; en résumé, elle précise l'action de l'organisme "sur le médicament" (contrairement à la pharmacodynamie qui s'intéresse à l'action du médicament sur l'organisme).

Le recours à la pharmacocinétique dans le développement d'un médicament antiparasitaire peut donc intervenir à plusieurs niveaux :

- 1) Sélection d'un principe actif parmi plusieurs molécules homologues d'un point de vue pharmacodynamique
- 2) Développement d'une nouvelle formulation pharmaceutique
- 3) Obtention d'une AMM répondant aux critères fixés dans les textes européens (*Arrêté Ministériel du 04/07/1977, journal officiel du 30/07/1977*)
- 4) Ajustements posologiques prenant en compte l'espèce animale et le statut physiologique.

Sur la base de ce dernier critère, l'étude pharmacocinétique que nous avons réalisée a eu pour but de mettre en évidence l'influence du sexe de l'animal traité sur la concentration plasmatique de la sélamectine après une application d'une formulation spot-on à raison de 6 mg/kg de cette molécule endectocide (Stronghold[®], Pfizer Santé Animale*) chez le chien ; l'objectif à plus grande échelle étant de réaliser un ajustement thérapeutique du produit chez les chiens mâles versus femelles.

Les résultats de cette étude pharmacocinétique ont donné lieu à une publication dans *Veterinary Research Communications* consultable en annexes de ce polycopié. Ils sont précédés d'une étude bibliographique sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la sélamectine et sur ses indications en clinique des carnivores domestiques, plus particulièrement chez le chien.

* *Pfizer Santé Animale France : 23-25 avenue du Dr Lannelongue
75 668 Paris Cedex 14*

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1. Classification et historique des principaux benzimidazoles*(Mc Kellar et Scott, 1990 - www.tours.inra.fr, 2001)*

Molécules	Date d'introduction	Spectre d'action chez les carnivores domestiques
Phénothiazine	1938	
Premiers benzimidazoles		
Thiabendazole	1961 (Brown <i>et al.</i>)	
Parbendazole	1967 (Actor <i>et al.</i>)	
Cambendazole	1970 (Hoff <i>et al.</i>)	
Mebendazole	1971 (Brugman <i>et al.</i>)	<i>Toxocara canis</i> <i>Toxascaris leonina</i> <i>Trichuris vulpis</i> <i>Ancylostoma caninum</i>
Oxibendazole	1973 (Théodorides <i>et al.</i>)	
Nouvelle génération de benzimidazoles : peu hydrosolubles		
Fenbendazole	1974 (Baeder <i>et al.</i>)	Spectre mebendazole + <i>Taenia</i> spp
Oxfendazole	1975 (Averkin <i>et al.</i>)	
Albendazole	1976 (Théodorides <i>et al.</i>)	
Triclabendazole	1983 (Boray <i>et al.</i>)	
Pro-benzimidazoles : prodrogues (carbamates de benzimidazole) converties en métabolites actifs plus hydrosolubles et moins toxiques pour l'animal traité		
Febentel ↓ Fenbendazole ↓↑ oxfendazole	1983 (Delatour & Euzeby)	Spectre mebendazole + <i>Uncinaria stenocephala</i>
Netobimin ↓ Albendazole ↓ Albendazole oxyde	1983 (Nafissi-Varchei)	
Efficacité sur les nématodes, les cestodes et les trématodes		
Luxabendazole	1986 (Corba <i>et al.</i>)	

I. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SELAMECTINE

1.1. La naissance des endectocides

Les ruminants et les chevaux ont été les premières espèces à bénéficier d'anti-parasitaires vétérinaires. En 1938, la phénothiazine fut découverte [17] et, utilisée chez ces herbivores, elle s'est montrée efficace sur les nématodes digestifs [14] [29]. Cependant, dès le début des années 50 aux Etats Unis, certains parasites, tel *Haemonchus contortus*, présentaient déjà une résistance à la phénothiazine. Ce n'est pas la principale raison de son abandon de nos jours : des molécules bien plus efficaces et faciles d'emploi ont été développées au fil du temps.

Durant les années qui suivent l'apparition de cette résistance à la phénothiazine, les recherches se sont intensifiées afin de pallier le développement éventuel d'une résistance à plus grande échelle. C'est ainsi qu'en 1961 [7], les études de Brown *et al.* ont permis le lancement d'une nouvelle molécule à large spectre sur le marché : le thiabendazole [15] [19] [58], chef de file d'une nouvelle famille : les benzimidazoles (Tableau 1) [9] [27] [32].

Le développement de nouveaux dérivés (cambendazole, oxibendazole, albendazole,...) s'est ensuite révélé nécessaire pour éviter l'hydroxylation enzymatique du thiabendazole (qui provoque une baisse de son efficacité voire même une inactivation).

Un autre problème spécifique des benzimidazoles s'est alors posé : ils sont peu solubles dans l'eau et leur absorption intestinale est médiocre, donc l'efficacité contre les nématodes gastro-intestinaux n'est pas optimale. Plusieurs pro-drogues ont alors été utilisées alternativement, les pro-benzimidazoles ou carbamates de benzimidazoles (thiophanate, fébentel, nétohimin, bénomyl) qui sont non seulement plus solubles (donc plus efficaces sur les nématodes en migration), mais aussi moins toxiques pour l'hôte [21].

Tableau 2. Classification et historique des principaux endectocides*(Mc Kellar et Benchaoui, 1996)*

Molécules (date de première découverte)	Date de mise sur le marché vétérinaire	Premières espèces traitées	Premières doses employées
Avermectines (Burg <i>et al.</i> , 1979)		Efficacité démontrée dans : - CN : la prévention de la dirofilariose (Blair et Campbell, 1979) - CV : le traitement de l'onchocercose (Herd et Donham, 1983) (Pulliam et Preston, 1989)	
Ivermectine	1981 (Chabala <i>et al.</i> , 1980)	BV	200 µg / kg SC/VO 500 µg / kg pour-on
		OV	200 µg / kg SC/VO
Abamectine (avermectine B ₁)	1985 (Tahir <i>et al.</i> , 1986) (De Chancet <i>et al.</i> , 1988)	BV	200 µg / kg SC
Doramectine (Dutton <i>et al.</i> , 1991)	1993 (Goudie <i>et al.</i>) Brésil / Afrique du Sud	BV	200 µg / kg SC 500 µg / kg pour-on
Eprinomectine	1996 (Shoop <i>et al.</i>)	BV	500 µg / kg pour-on
Sélamectine	2000 (Jacobs <i>DE</i>)	CN / CT (dès 1998)	6 mg / kg Spot-on
Milbémocines (1973) → Milieu des années 80 (Takiguchi <i>et al.</i> , 1980)			
Milbémocine D	1984 (Sakamoto <i>et al.</i>) 1985 (Tagawa <i>et al.</i>)	CN : prévention de la dirofilariose (Japon)	1000 µg / kg VO
Moxidectine	1990 (Argentine)	BV (SC) OV (VO)	200 µg / kg
Milbémocine oxime	1990 (USA)	CN : prévention de la dirofilariose et traitement de l'ankylo- -stomose & de la démodécie	500 µg / kg VO (par mois pour la prévention)

L'évolution des techniques d'élevage, telles que l'augmentation du pâturage extensif dans la gestion de milieux protégés ou le débroussaillage (qui a permis d'ouvrir de nouveaux espaces), a vu l'apparition d'un équilibre fragile entre le développement d'une biodiversité tant végétale qu'animale et l'utilisation irraisonnée de certains médicaments vétérinaires.

L'étude des différents antiparasitaires utilisés a montré d'une part que les principes actifs sont souvent éliminés majoritairement par voie fécale, et d'autre part qu'ils n'ont pas tous le même impact sur l'environnement : certains d'entre eux entraînent une létalité importante sur la faune coprophile [31] [37].

La découverte des endectocides, nouvelle catégorie d'anthelminthiques (Tableau 2), a permis une meilleure gestion du parasitisme avec une moindre atteinte de l'écosystème selon la formulation galénique ; par exemple la formulation *bolus* a été abandonnée en raison du rejet d'une trop grande quantité de produit dans l'environnement par les animaux traités. Ce nouveau groupe de molécules antiparasitaires a de plus apporté une solution face aux résistances développées par les parasites contre les benzimidazoles [11].

Les endectocides, qui regroupent les avermectines et les milbémycines, sont des lactones macrocycliques. Ce sont des composés de semi-synthèse qui sont obtenus par fermentation par un actinomycète du genre *Streptomyces* [8], et qui possèdent des similitudes dans leurs structures chimiques [22] [39] [43].

La fermentation de *Streptomyces avermitilis* donne les avermectines. La fermentation de *Streptomyces hygroscopicus* et de *Streptomyces cyanogriseus* donne les milbémycines.

Historiquement, depuis 1973, les milbémycines étaient utilisées comme acaricides et insecticides sur les plantes ; ce que l'on retrouve dans l'étymologie de leur nom :

milbe- pour "mite" (arthropode) + ***-myc-*** car molécule extraite à partir d'un champignon + ***-ine-*** suffixe pour les produits pharmaceutiques

Le spectre d'action complet des milbémycines n'a cependant été mis en évidence qu'avec la découverte de l'activité nématodicide des avermectines en 1975 [13][44] :

a- pour sans + ***-verm-*** pour "worm" (ver) + ***-ect-*** pour ectoparasite
+ ***-ine-*** suffixe pour les produits pharmaceutiques

Note 1 : Définition de l'indice thérapeutique (IT)

L'indice thérapeutique est utilisé pour décrire la sécurité d'un médicament. Il est défini comme le rapport de deux autres paramètres :

- La DL_{50} ou Dose Létale pour laquelle 50% des individus traités sont susceptibles de mourir ou de déclarer des effets secondaires.
- La DE_{50} ou Dose Efficace pour laquelle 50% des individus développent une réponse suite à l'administration du médicament.

On peut alors définir l'indice thérapeutique comme suit :

$$IT = DL_{50} / DE_{50}$$

En général, on recherche une dose avec un maximum d'efficacité et un minimum d'effets indésirables, pour cela l'IT doit être le plus large possible.

Bien que les avermectines et les milbémycines n'aient aucune action sur les trématodes ni sur les cestodes, leur large spectre d'activité sur les nématodes ainsi que sur plusieurs parasites externes leur a valu leur appellation d'endectocides :

end- pour endoparasites (vers) + **-ecto-** pour ectoparasites (insectes, acariens...)
+ **-cide** pour "tuer".

A partir de 1981, l'ivermectine a été lancée sur le marché vétérinaire [4][10][63] ; dans un premier temps, elle était destinée au bétail, résolvant ainsi les problèmes de résistance aux benzimidazoles, puis son utilisation s'est étendue aux chevaux, porcs, chiens [1], chameaux, rennes, et enfin à l'homme.

Aujourd'hui, quatre avermectines et milbémycines sont utilisées chez le chien : l'ivermectine (par exemple *Ivomec*[®], Merial) sans autorisation légale, l'oxime de milbémycine (par exemple *Milbemax*[®] ou *Interceptor*[®], Novartis) et la moxidectine (par exemple associée à l'imidaclopride dans *Advocate*[®], Bayer Health Care).

L'oxime de milbémycine possède une marge de sécurité qui autorise son utilisation à des doses plus élevées d'où un spectre d'action plus large.

Ces marges de sécurité, lors des traitements par les endectocides, se sont révélées d'autant plus importantes que des manifestations d'hypersensibilité ont été rapportées dans certaines lignées de chiens de race *Colley* [48] [45] [61] [62] [46] [20]. L'indice thérapeutique (Note 1, p22) permet de déterminer la sécurité d'utilisation d'un médicament. Dans le cas des avermectines et des milbémycines, aucune (à part l'oxime de milbémycine [62]) ne présentait un indice thérapeutique acceptable pour lutter à la fois contre les ecto- et les endo-parasites chez les carnivores domestiques.

La sélamectine est la première avermectine indiquée chez le chien et le chat, qui ait cette efficacité à la fois sur les ecto- et les endo-parasites tout en assurant une bonne sécurité d'emploi chez les *Colley* [23] [42] [25].

Des études de tolérance à la sélamectine chez le chien et le chat, menées par les laboratoires Pfizer Santé Animale, montrent que l'administration mensuelle de sélamectine (Stronghold[®], 6 mg/kg en spot-on) à 10 fois la dose recommandée chez 16 chiots et 16 chatons de 6 semaines n'a engendré aucun effet secondaire détectable. De même, chez 24 chiens de race *Colley*, l'administration mensuelle de sélamectine (Stronghold[®], 6 mg/kg en spot-on) à 5 fois la dose recommandée pendant 3 mois, n'a engendré aucun effet secondaire indésirable [64].

1.2. Structure chimique de la sélamectine

Avermectines et milbémycines sont produites par les actinomycètes du genre *Streptomyces* ; elles ont le même mode d'action et le même mécanisme de toxicité chez les mammifères [33].

La fermentation de *Streptomyces avermitilis* donne huit avermectines regroupées sous les dénominations A_{1a} , A_{1b} , A_{2a} , A_{2b} , B_{1a} , B_{1b} , B_{2a} , B_{2b} :

- les composés **A** ont un groupement méthoxy- ($-O-CH_3$) en C_5
- les composés **B** ont un groupement hydroxy- ($-OH$) en C_5
- les composés **1** ont une double liaison entre C_{22} et C_{23}
- les composés **2** ont une liaison simple entre C_{22} et C_{23} et un groupement hydroxy- en C_{23}
- les composés **a** ont une chaîne butyl- (C_4H_9-) en C_{25}
- les composés **b** ont une chaîne isopropyl- ($-CH-(CH_3)_2$) en C_{25}

Parmi ces huit composés naturels produits par *Streptomyces avermitilis*, quatre sont dits mineurs (les composés *b* : A_{1b} , A_{2b} , B_{1b} et B_{2b}) car synthétisés en petite quantité (entre 10 et 20% de la totalité des huit composés). Les quatre autres composés sont dit majeurs (les composés *a* : A_{1a} , A_{2a} , B_{1a} et B_{2a}) et sont synthétisés en plus grande quantité lors de la fermentation (entre 80 et 90% de la totalité des huit composés), ce qui en fait de bons candidats pour une production industrielle.

Le développement s'est donc orienté dans un premier temps vers les composés *a*. Parmi eux, les composés B_1 ont la meilleure efficacité sur les nématodes. Les composés B_2 ont, eux, une meilleure sécurité d'emploi. A titre de comparaison, la DL_{50} (Note 1) chez la souris des composés B_1 est de 15 mg/kg et celle des composés B_2 est de 50 mg/kg.

Par exemple, l'ivermectine est un hybride de composés B_1 et B_2 , ce qui en fait un produit avec à la fois une bonne efficacité sur les nématodes et une bonne sécurité d'utilisation (la DL_{50} est de 30 mg/kg chez la souris).

Tableau 3. Différences majeures des structures chimiques entre plusieurs avermectines et milbémycines.

Nom de l'endectocide	Spécificité de la liaison C ₂₂ -C ₂₃	Radical(aux) sur C ₂₅
AVERMECTINES		
Abamectine (avermectine B1 _{a/b})	Double	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ pour la molécule B1 _a -CH(CH ₃) ₂ pour la molécule B1 _b
Ivermectine (22,23 dihydroavermectine B1 _{a/b})	Simple	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ pour la molécule B1 _a -CH(CH ₃) ₂ pour la molécule B1 _b
Doramectine	Double	Cyclohexyl- + -OH en C ₅ (hydroxyle) + disaccharide en C ₁₃
Sélamectine	Simple	Cyclohexyl- + -NOH en C ₅ (oxime) + monosaccharide en C ₁₃
MILBEMYCINES		
Milbemycine D	Simple	-CH(CH ₃) ₂
Oxime de milbémycine	Simple	CH ₃ <i>et</i> C ₂ H ₅ + -NOH en C ₅
Moxidectine	Simple	-C(CH ₃)=CH-CH(CH ₃)-CH ₃ + NOCH ₃ en C ₂₃

La fermentation de *Streptomyces hygrosopicus* et de *Streptomyces cyanogriseus* donne les milbémycines sur le même principe que *Streptomyces avermitilis* avec des composés **A** et des composés **B**, des composés **1** présentant une liaison simple entre C₂₂ et C₂₃, et des chaînes méthyl- (-CH₃), éthyl- (-C₂H₅), [etc...] en C₂₅ (Tableau 3).

Avermectines et milbémycines ont une structure chimique semblable reposant sur une même base à seize carbones greffée d'une unité hexa-hydro-benzofurane de C₂ à C₈ et d'une unité " spirochétale " de C₁₇ à C₂₅. Les molécules représentatives de chaque famille sont respectivement l'abamectine (ou avermectine B_{1a}) et la milbémycine D (Figure 5).

La différence majeure de structure entre les deux familles réside dans le groupement bisoléandrosyl- ou " disaccharide-osyl- " en C₁₃ des avermectines, absent chez les milbémycines : il est dit que les milbémycines sont des avermectines aglycones [40]. Enfin plusieurs groupements alkyl- (à base de carbone et d'hydrogène) sont possibles en C₂₅ (Tableau 3).

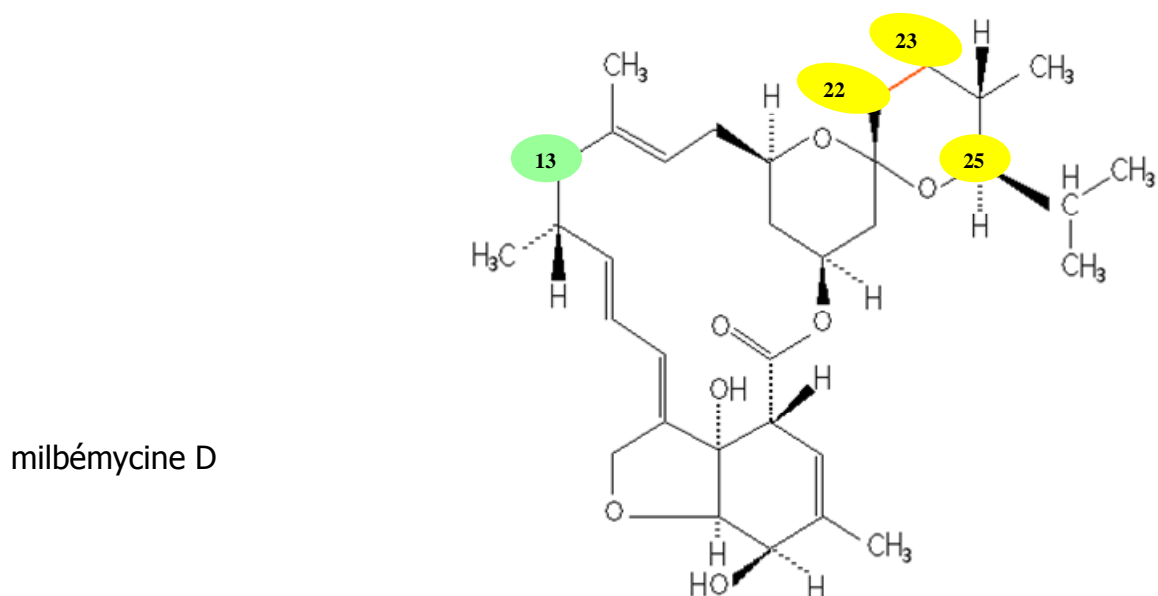
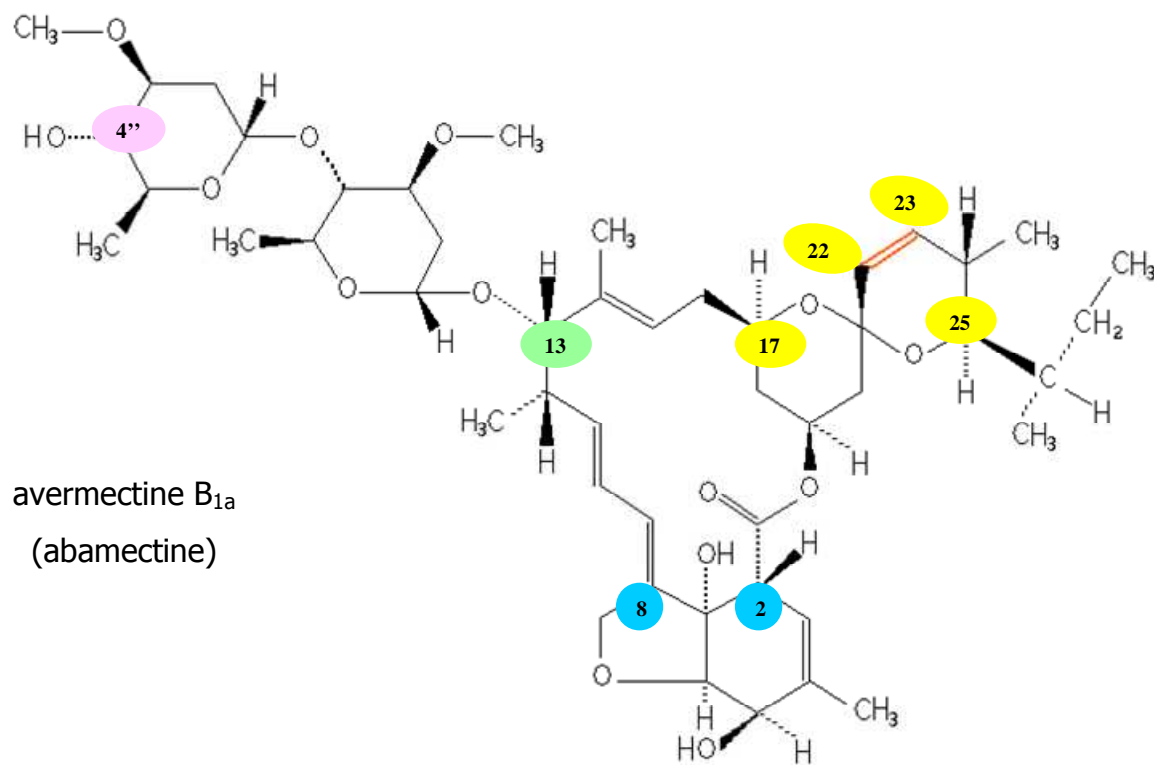


Figure 5. Comparaison de la structure chimique des avermectines et des milbémicines (d'après Mc Kellar & Benchaoui, 1996)

les molécules représentatives de chaque famille sont respectivement l'avermectine B_{1a} et la milbémicine D

Le noyau bisoléandrosyl- des avermectines n'est pas indispensable à leur activité biologique mais d'un point de vue stérique il constitue une cible très pratique pour des modifications chimiques des avermectines, comme des substitutions du groupement hydroxyle sur le C₄".

Ce groupement hydroxyle, atypique car greffé sur un "sucre", est d'accès facile donc plusieurs substitutions peuvent être envisagées (radical R-CO- ou acyl-, radical R-NH- ou amino-), ce qui permet de jouer sur la solubilité, la distribution, la stabilité de la molécule et, à plus grande échelle, sur la diversité du spectre d'action [56]. Par exemple l'éprinomectine est une avermectine dont le substituant en C₄" est un groupement acétylamino- (CH₃-CO-NH-) qui pourrait expliquer son moindre passage dans le lait par rapport aux autres avermectines.

Le noyau hexa-hydro-benzofurane des avermectines et des milbémycines, et en particulier le groupement hydroxyle en C₅ est, lui, corrélé à la puissance de la molécule et à la largeur du spectre : une délétion ou une substitution du groupement hydroxyle en C₅ entraîne une diminution immédiate de l'efficacité de la molécule [56].

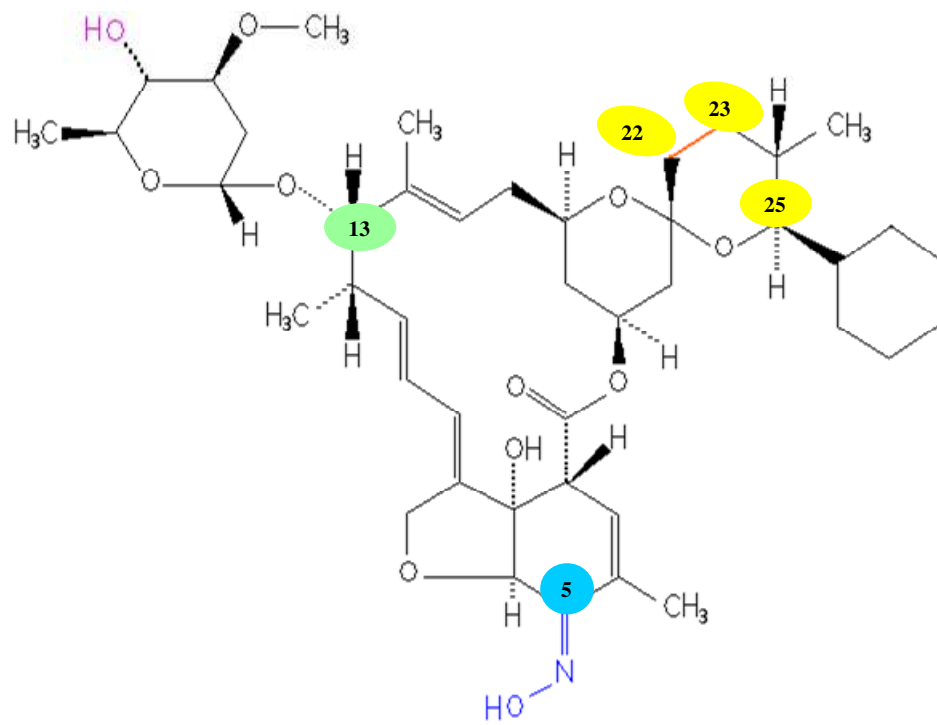


Figure 6. Structure chimique de la sélamectine (d'après Bishop et al., 2000)

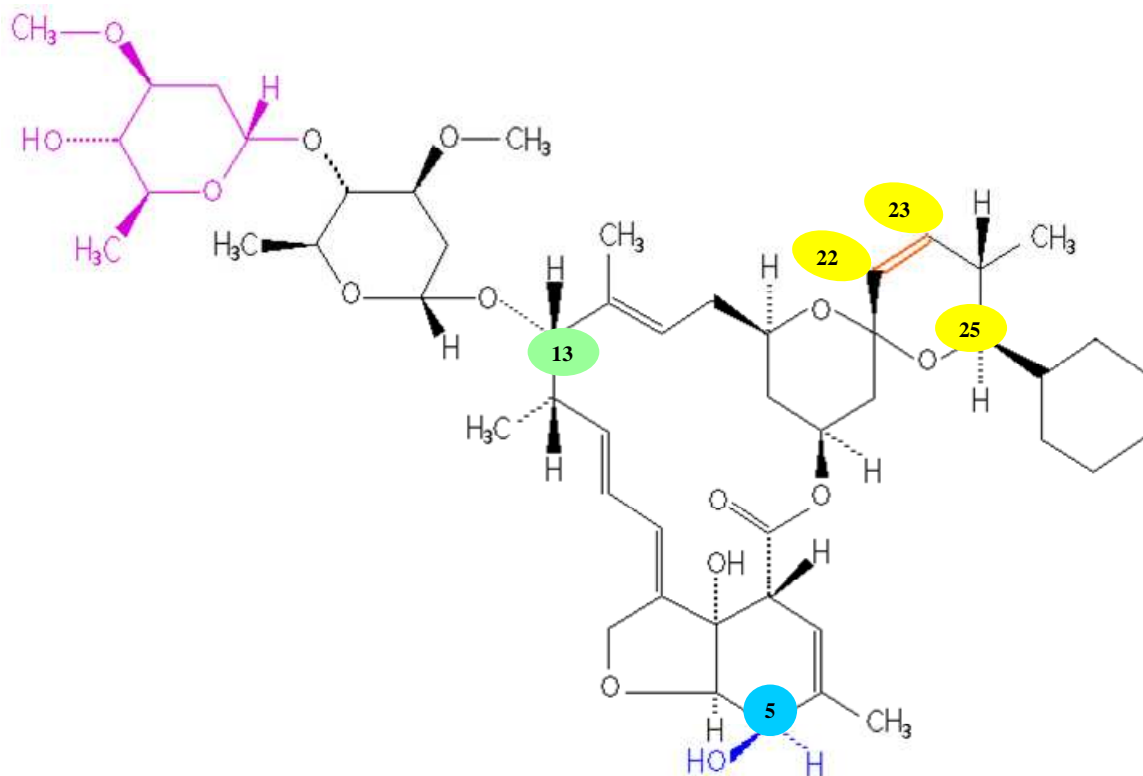




Figure 7. Structure chimique de la doramectine (d'après Bishop et al., 2000)

Les substituants du carbone C₂₅ influent peu sur les caractéristiques de l'endectocide.

▲ Les groupements lipophiles, comme un cyclohexyl- () ou un cyclopentyl- (), permettent d'obtenir un meilleur temps de demi-vie tissulaire, mais sans autre amélioration des propriétés de la molécule B1.

▲ Les groupements polaires ne font généralement que diminuer l'activité de la molécule [56].

En résumé, les endectocides ont les propriétés physico-chimiques suivantes : un poids moléculaire élevé, une insolubilité dans l'eau, une solubilité dans la plupart des solvants organiques, un dosage possible par HPLC (High Performance Liquid Chromatography dont le principe sera décrit dans la deuxième partie de cette étude).

La sélamectine est un composé semi-synthétique obtenu à partir de la doramectine, avermectine produite par fermentation d'un mutant de *Streptomyces avermitilis* (Figure 6) [6] [16] [51]. La seule différence structurale entre la doramectine et l'abamectine, molécule représentative des avermectines, est le substituant du carbone C₂₅ : l'abamectine a un groupement éthyl- (-C₂H₅) ; la doramectine, elle, a un groupement cyclohexyl- d'où elle tire son nom de 25-cyclohexylavermectine B1. La sélamectine diffère de la doramectine par deux groupements et une liaison entre deux carbones (Figures 6 et 7) :

- en C₁₃, la doramectine a un disaccharide ; la sélamectine n'a plus qu'un monosaccharide
- en C₅, la doramectine a un groupement hydroxyle (-OH) ; la sélamectine présente, elle, un groupement oxime (=N-OH)
- entre C₂₂-C₂₃ la doramectine a une double liaison ; la sélamectine n'a plus qu'une simple liaison.

La dénomination chimique de la sélamectine est ainsi *25-cyclohexyl-4'-O-de(2,6-dideoxy-3-O-methyl- α -L-arabino-hexopyranosyl)-5-demethoxy-25-de(2-methylpropyl)-22,23-dihydro-5-(hydroxyimino) avermectine A1_a*.

Le principe actif obtenu se présente sous la forme brute d'une poudre blanche, dont la formule moléculaire est C₄₃H₆₃NO₁₁ et le poids moléculaire est 770 kDa.

Tableau 4. Action des anthelminthiques sur des cibles biochimiques(*www.tours.inra.fr*, 2001)

Famille de molécule	Cible	Noms génériques
Benzimidazoles	β -tubuline	Thiabendazole, Cambendazole, Oxibendazole, Albendazole, Fenbendazole, Oxfendazole, Mebendazole
Pro-benzimidazoles	β -tubuline	Thiophanate, Febentel
<i>Action sur les nématodes, cestodes et trématodes</i>		
Salicylanilides	Protons ionophores	Closantel, Rafoxanie, Oxyclozanide, Niclosamide, Dibromosalan
<i>Action sur le nématode Haemonchus contortus</i>		
Organophosphorés	Choline-estérase	Dichlorvos, Trichlorphon, Naphtalophos
<i>Action sur les nématodes et les insectes</i>		
Imidothiazoles	Récepteur à l'acétylcholine	Lévamisole, Tétramisole
<i>Action sur les nématodes</i>		
Tétrahydropyrimidines	Récepteur à l'acétylcholine	Morantel, Pyrantel
<i>Action sur les nématodes</i>		
Lactones macrocycliques	Canaux à chlore	Ivermectine, Abamectine, Doramectine, Moxydectine
Pipérazine	Récepteur à l'acide gamma amino-butérique (GABA)	Pipérazine citrate
<i>Action sur les nématodes et les insectes parasites</i>		

1.3. Action biologique de la sélamectine

Le mode d'action d'un antiparasitaire consiste généralement en une fixation de la molécule active sur une cible biochimique vitale du parasite (Tableau 4) [49].

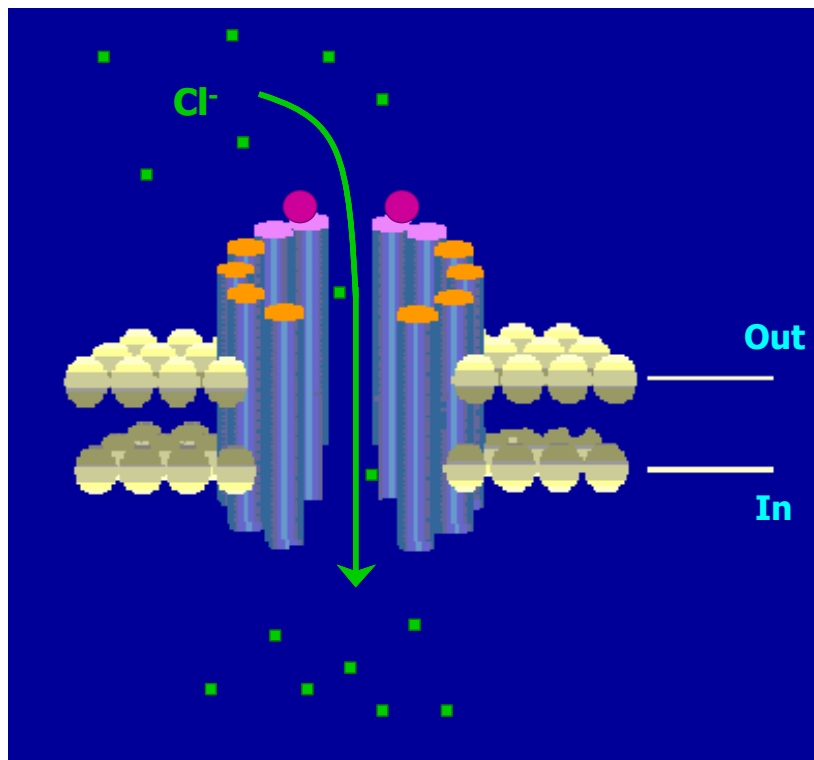
La sélamectine, en tant qu'endectocide, interagit stéréospécifiquement et avec une haute affinité sur les canaux à chlore glutamate-dépendant [53] [2] [3]. La fixation sur les sites du glutamate provoque un flux entrant d'ions chlorure dans les membranes des tissus nerveux périphériques du parasite ciblé (arthropodes, nématodes) [42], ce qui est responsable de la paralysie et de la mort du parasite ciblé (Figure 8).

En effet, les ions chlorure chargés négativement hyperpolarisent le neurone, ce qui le rend moins réactif à un potentiel d'action [53] ; il en résulte une interruption de la transmission des potentiels de membrane, ce qui explique la paralysie du parasite (en particulier au niveau des muscles du pharynx).

Les endectocides qui sont à la fois nématocides, insecticides et acaricides, n'ont donc aucune efficacité sur les cestodes (vers plats) qui ne possèdent pas de récepteur au glutamate.

Chez les mammifères, les canaux à chlore glutamate-dépendant présents chez les invertébrés ciblés n'ont jamais été mis en évidence mais on trouve d'autres canaux à chlore présents dans le système nerveux central [54] : il s'agit du système GABA (Acide Gamma-Amino-Butyrique). Mais ces neurones sont protégés des effets de la sélamectine par la barrière hémato-méningée, d'où une innocuité – théorique, nous le verrons plus loin – des endectocides chez les vertébrés.

Au sens médical du terme, la barrière hémato-méningée est le système qui assure les échanges entre le tissu nerveux et le système vasculaire cérébral. D'un point de vue pharmacologique, elle est constituée de l'ensemble des mécanismes qui restreignent les échanges entre, d'une part le sang et d'autre part, le liquide céphalo-rachidien et le parenchyme du système nerveux central.



*D'après documents de l'INRA de
St Martin du Touch -
<http://capoul.toulouse.inra.fr>*

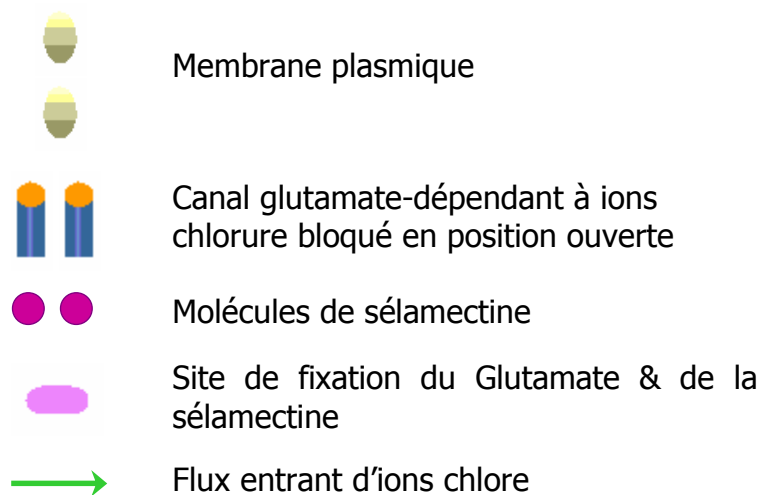
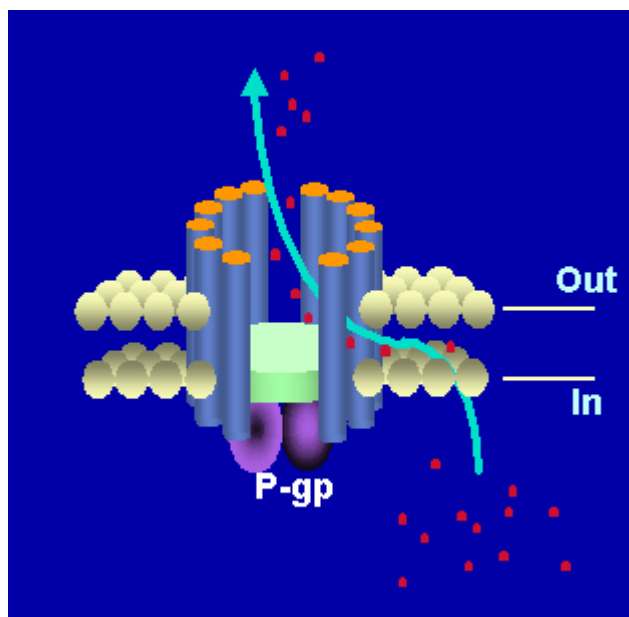
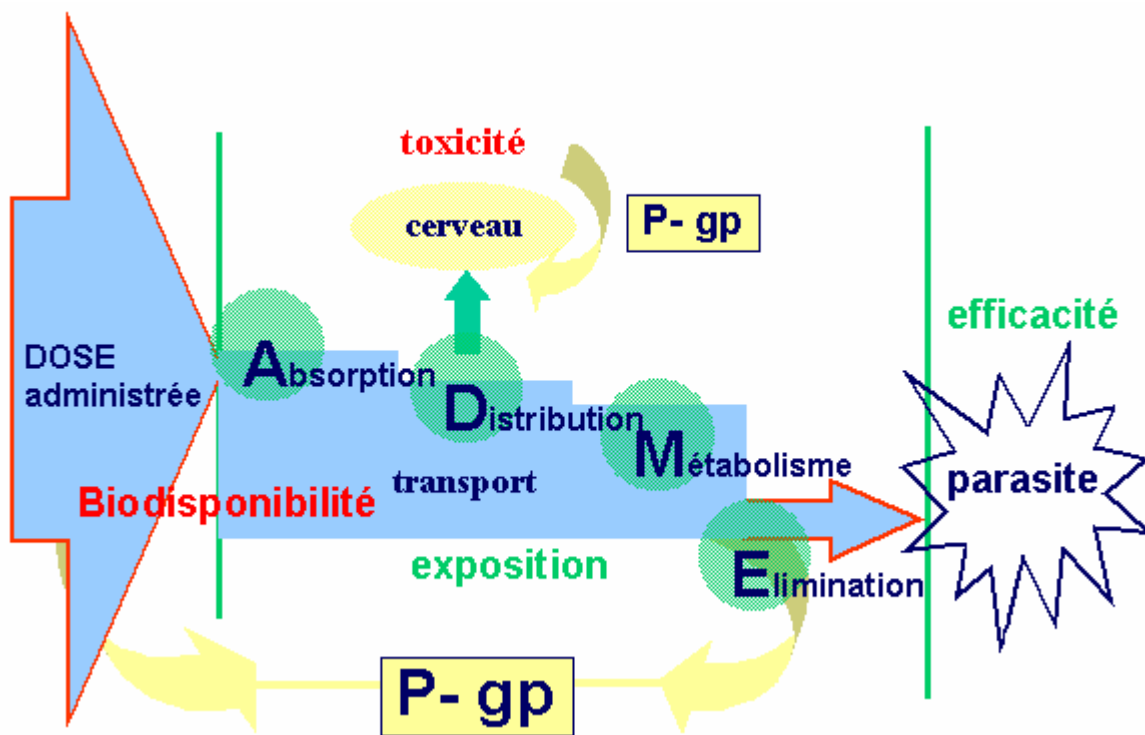


Figure 8. Action de la sélamectine sur les canaux ioniques des cellules nerveuses et musculaires des parasites ciblés.



D'après documents de l'INRA de
St Martin du Touch -
<http://capoul.toulouse.inra.fr>

Figure 9. Rôle de la glycoprotéine P au niveau de la barrière hémato-méningée : expulsion de molécules vers le sang



*D'après documents de l'INRA de
St Martin du Touch -
<http://capoul.toulouse.inra.fr>*

Figure 10. Implication de la P-gp dans la pharmacocinétique des endectocides

Ces expériences prouvent ainsi que la toxicité de l'ivermectine, chez les chiens de race *Colley*, est liée à une anomalie génétique qui se traduit par une absence de la glycoprotéine P-gp "de détoxification" au niveau de la barrière hémato-méningée.

Ces échanges sont notamment assurés par une protéine de transport transmembranaire qui fait partie intégrante de la barrière hémato-méningée : la glycoprotéine P encore appelée la P-gp [54]. Cette protéine permet, en particulier, de refouler certaines molécules médicamenteuses du cerveau vers le sang (Figures 9 et 10).

En 1985, le docteur Jerram, vétérinaire exerçant en Nouvelle Zélande, décrit un cas d'intoxication chez un *Colley* auquel il avait administré 200 µg/kg d'Ivomec® (une formulation de l'ivermectine indiquée pour les bovins et les ovins à cette même posologie) par voie sous-cutanée après avoir diagnostiqué une gale sarcoptique chez l'animal : 24 heures après l'injection, le chien était ataxique et présentait une amaurose. Malgré un traitement anti-choc, l'animal entra dans un coma profond et fut euthanasié [24]. Le vétérinaire rapporta cet incident au laboratoire Merck, qui lui révéla alors l'existence de plusieurs cas semblables d'intoxication en Nouvelle Zélande et en Australie, et toujours sur des chiens de race *Colley*.

Ce n'est que 15 ans plus tard, que l'équipe de Mealey (2001) proposa une explication de cette sensibilité particulière des *Colley* qui serait due à une altération du gène d'expression de la P-gp [38]. Le travail de Lankas *et al.*, en 1997, avait déjà mis en évidence qu'une déficience en P-gp chez la souris était à l'origine d'une neurotoxicité accrue vis-à-vis des avermectines [26]. Cette déficience est provoquée par une mutation du gène *mdr-1* (*mdr* pour multi-drug-resistance) qui code la protéine P-gp. La mutation consiste en une délétion de quatre paires de bases sur *mdr-1*, ce qui génère un codon stop prématuré dans la séquence, d'où l'absence de P-gp fonctionnelle. Après avoir démontré directement la relation entre cette mutation et une sensibilité à l'ivermectine, les différents tests de sensibilité ont montré que les chiens homozygotes pour cette délétion ont un phénotype de sensibilité à l'ivermectine (absence de P-gp) et les autres (hétérozygotes ou homozygotes "sains") ne présentent pas de sensibilité accrue à l'ivermectine [12].

Les signes d'intoxication chez les chiens déficients en P-gp sont tout à fait typiques d'une interaction de l'ivermectine sur le système inhibiteur GABA : ataxie, léthargie, mydriase, hypothermie, tremblements puis coma voire mort.

Ces expériences prouvent ainsi que la toxicité de l'ivermectine, chez les chiens de race *Colley* [48], est liée à une anomalie génétique qui se traduit par une absence de la glycoprotéine P-gp "de détoxification" au niveau de la barrière hémato-méningée [54].

Chez les animaux à risque, il semblerait que la sélamectine ainsi que les milbémycines se concentrent moins dans le système nerveux central, ce qui expliquerait leur moindre toxicité par rapport à l'ivermectine. La littérature reste cependant peu fournie à ce sujet.

La sélamectine est, à ce jour, la seule avermectine enregistrée pour un usage chez le chien et le chat (c'est-à-dire possédant une AMM). Nous allons maintenant envisager les indications *in vivo* de cet endectocide.

II. ACTION *IN VIVO* DE LA SELAMECTINE

Rappel sur les parasitoses du chien et du chat

Les carnivores domestiques hébergent très souvent des parasites qui les spolient par définition, et qui peuvent également se révéler néfastes pour les propriétaires des animaux. Les parasites sont soit externes soit internes.

Les premiers, appelés ectoparasites, sont les poux, tiques, cheyletielles, puces, acariens agents de gales.

Certains sont agents de zoonoses : les sarcoptes (gale) et les cheyletielles.

Les seconds, ou endoparasites, sont soit des vers ronds (ascarides, ankylostomes, trichures) soit des vers plats (regroupés sous le nom de *ténias*).

Pour les ascarides et les ankylostomes, les jeunes animaux sont souvent infestés par la mère, via le placenta ou pendant la lactation. Les jeunes animaux sont fragiles car leur système immunitaire est immature. La mise en place d'un programme de prévention des infestations et réinfestations des animaux de compagnie dès le plus jeune âge est donc une nécessité pour leur santé.

C'est également une nécessité pour la santé publique puisque certains parasites peuvent être transmis à l'homme : la maladie déclarée par ce dernier est appelée une zoonose ; elle peut avoir des conséquences très graves (par exemple les larves d'ascarides, retrouvées dans les bacs à sable, peuvent entraîner une cécité).

Introduction à l'utilisation clinique de la sélamectine chez le chien

Notre étude ne concerne que le chien, nous allons donc nous intéresser à son action et à son devenir chez cet hôte.

La sélamectine est plus ou moins efficace selon le parasite et le stade de développement traités. Les indications thérapeutiques de la sélamectine, comme tout endectocide, couvrent à la fois des parasites externes et internes à l'exception des vers plats (Cf paragraphe 1.3) [65].

Chez le chien, la sélamectine est enregistrée avec pour indications le traitement et la prévention des infestations par les puces dues à *Ctenocephalides spp.* Le DMV (2005) complète alors cette première indication par le fait qu'elle peut *être intégrée dans un programme thérapeutique contre la Dermatite Allergique par Piqûres de Puces (DAPP)*. La sélamectine est également indiquée dans les traitements de la gale sarcoptique à *Sarcoptes scabiei*, de la phtiriose à *Trichodectes canis* et des ascaridoses intestinales dues à *Toxocara canis*. Enfin, elle peut être prescrite dans la prévention de la dirofilariose à *Dirofilaria immitis* [64] [65].

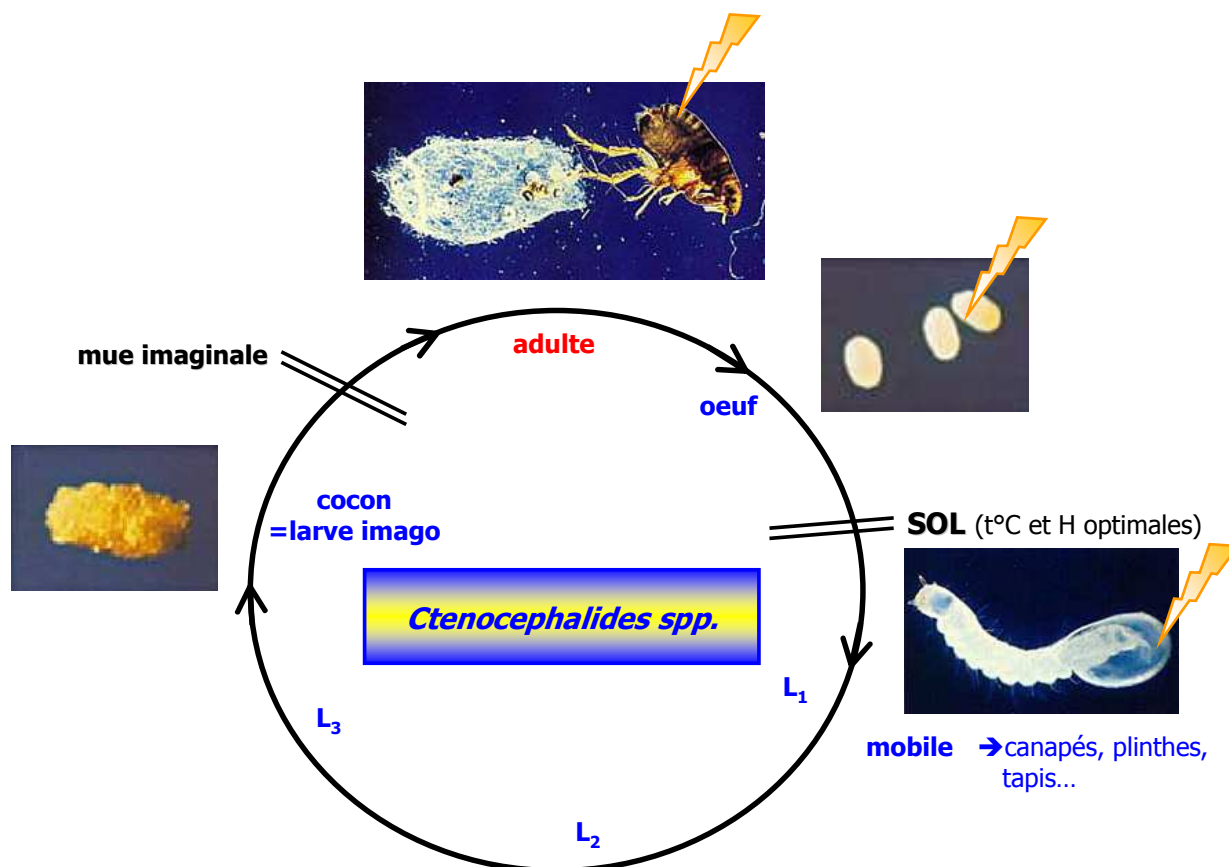


Figure 11. Cycle de développement de *Ctenocephalides spp.*, agent de pulicose.



Stades sur lesquels la selamectine est efficace : [6] [34]

- adulticide
- ovicide - larvicide
- diminution de la capacité des œufs à se développer en larves, et des larves en adultes

Photos tirées des sites web suivants :

- www.placervillevet.com/flea_life_cycle.htm
- www.nixonandmarshall.co.uk/flealifecycle_diag.html
- www.animalhealth.bayerhealthcare.com/Fleas.328.0.html

2.1. Prévention et traitement de la pulicose (Figure 11) [34]

La pulicose est provoquée par un insecte piqueur, la puce (genre *Ctenocephalides*). Les symptômes sont définis par l'apparition d'une papule au niveau de la piqûre associée à un fort prurit et des dépilations. Leur intensité est proportionnelle au nombre de piqûres de puces. Chez certains chiens, on observe parfois l'installation d'une seconde phase : la phase d'hypersensibilité caractérisée par un prurit très violent, une exsudation et des surinfections bactériennes. Cette pathologie se nomme dermatite allergique aux piqûres de puces (DAPP) dont l'intensité des symptômes est indépendante du nombre de piqûres.

Des tests *in vivo*, menés par Pfizer Santé Animale, ont comparé un groupe de chiens traités avec la sélamectine et un groupe de chiens traités avec un placebo. Les résultats ont montré une efficacité de la sélamectine sur les puces adultes ainsi que sur les œufs [64] :

une dose unique de Stronghold® (6 mg/kg) réduit significativement le nombre de puces adultes (- 98%, 36 heures après application) et le nombre total d'œufs produits (- 97,8% à 100% sur une période de 30 jours).

NB : La puce est un hôte intermédiaire dans le cycle de *Dypilidium caninum* (cestode du chien). La larve de puce mange les fécès du chien et ingère ainsi les œufs du ver qui se développent ensuite en larves cysticercoïdes. Le chien s'infeste en avalant des puces contaminées.

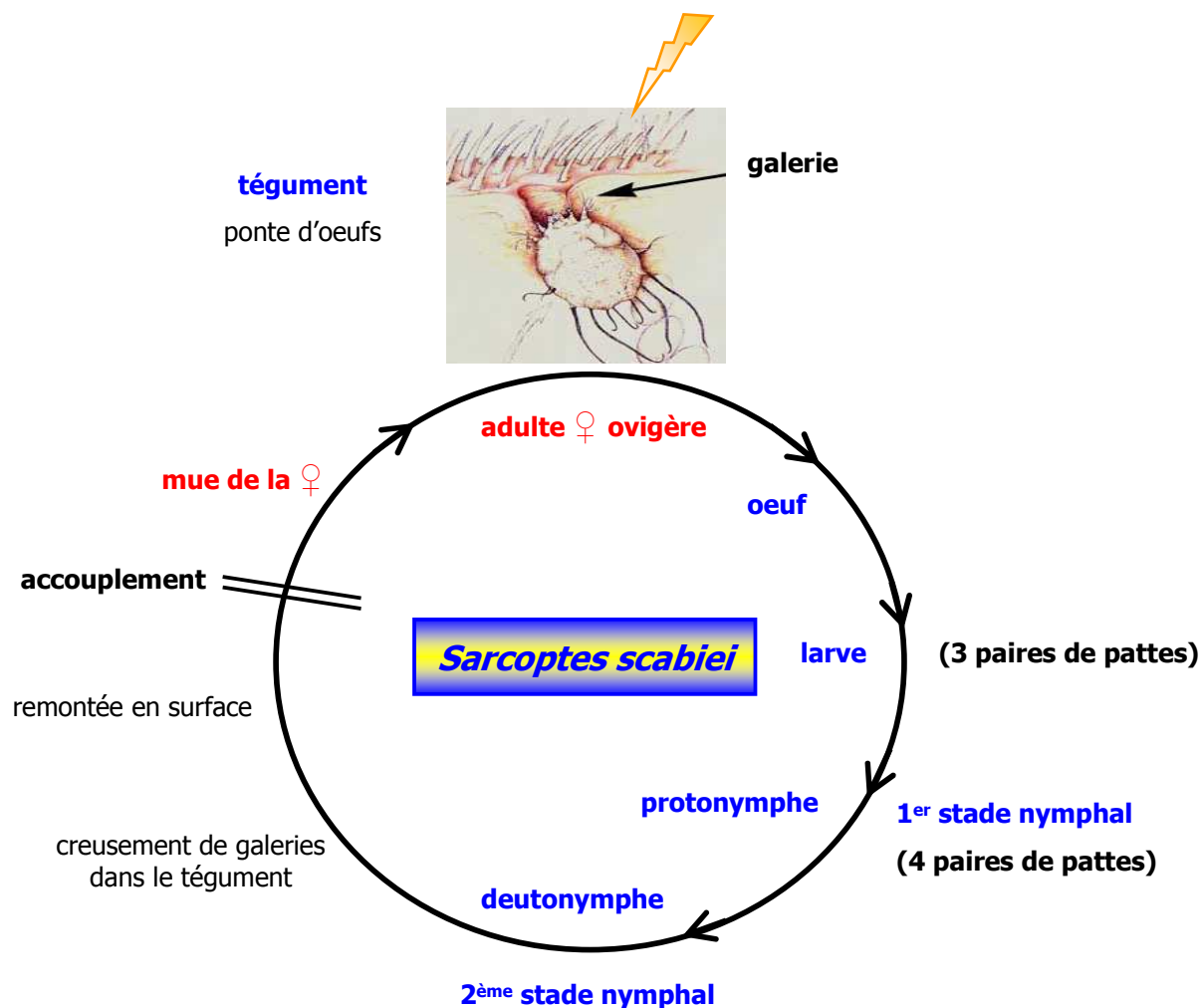


Figure 12. Cycle de développement de *Sarcoptes scabiei*, agent de gale.



Stades sur lesquels la selamectine est efficace :
- adultes [55]

Photos tirées des sites web suivants :

- www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/sarcoptes.html
- www.coeur-sauvage.com/veto/maladie/gale_sarcoptique.htm
- www.dr-dan.com/sarcopt.htm

2.2. Traitement de la gale sarcoptique (Figure 12) [55]

La gale sarcoptique du chien est due à un acarien, *Sarcoptes scabiei*. Les symptômes de la gale sarcoptique apparaissent après une période de latence (durant laquelle le chien est porteur du parasite et peut le transmettre). Les signes cliniques sont liés au creusement de galeries dans le tégument du chien par les parasites femelles ovigères. Au début la dermatose se caractérise par un prurit constant, des dépilations caractéristiques en mouchetures et des boutons de gale. On observe ensuite une phase d'extension eczémaïde caractérisée par une augmentation des dépilations, des excoriations, un suintement et un épaissement de la peau et une adénopathie (due à la surinfection bactérienne).

En l'absence de traitement, la couche cornée s'épaissit (hyperkératose), et la parakératose aboutit à la formation d'une carapace : la peau s'épaissit, se plisse et suinte jusqu'à la formation de crevasses. L'état général du chien s'altère peu à peu et l'animal peut finir par mourir.

Les essais contrôlés (menés par Pfizer Santé Animale) montrent une bonne efficacité du traitement par la selamectine après une application unique de 6 mg/kg de Stronghold® (93,5% de parasites éliminés par rapport à un groupe d'animaux traités avec un placebo) et une excellente efficacité lors de deux applications à un mois d'intervalle (100% de parasites éliminés par rapport à un groupe d'animaux traités avec un placebo) [64].

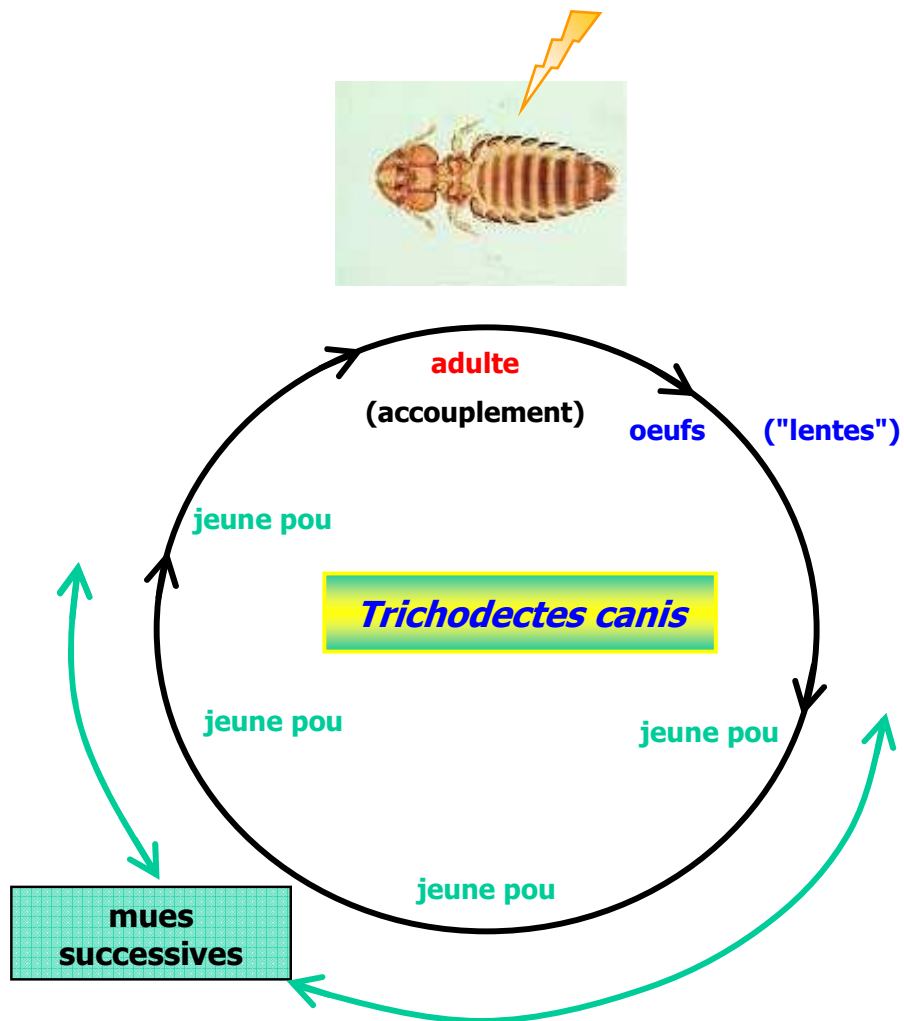


Figure 13. Cycle de développement de *Trichodectes canis*, un pou broyeur.



Stades sur lesquels la sélamectine est efficace :
- adultes

Photo tirée du site web suivant :
- www.ulb.ac.be/sciences/biodic/ImMorpion2.html

2.3. Traitement de la phtiriose à *Trichodectes canis* (Figure 13)

La phtiriose est provoquée par des poux. En Europe, les chiens sont les hôtes de deux espèces de poux : les poux piqueurs et les poux broyeur (se nourrissant de débris cutanés) et plus particulièrement de *Trichodectes canis*. La phtiriose au pou broyeur *Trichodectes canis* est caractérisée par du prurit, une dépilation et un squamosis importants. Un défaut d'hygiène et des poils longs sont des facteurs favorisant le développement des poux.

Généralement, tous les insecticides à application locale sont efficaces. Les insecticides administrés par voie systémique ont une efficacité bien plus discutable puisque les poux broyeurs ne se nourrissent pas de sang, à la différence des poux piqueurs.

Le Stronghold[®], bien que n'ayant pas d'AMM chez le chien contre la phtiriose, s'est montré efficace dans le traitement des chiens infestés par *Trichodectes canis* [64].

Cela tient au fait qu'une partie du produit est distribué dans le film lipidique superficiel du tégument.

2.4. Traitement des ascaridoses à *Toxocara canis* (Figure 14) [36]

La toxocarose est due à un ver chymivore qui spolie son hôte en acides aminés, vitamines et oligo-éléments dans l'intestin grêle (contrairement aux vers hématophages qui se nourrissent de sang).

Le chiot peut être contaminé dans l'utérus de sa mère, lors de la tétée ou par consommation d'œufs ou de larves L₂ infestantes du parasite dans l'environnement. Les ascarides sont responsables de retards de croissance, d'un mauvais état général (poil piqué, asthénie), de troubles digestifs (diarrhées, vomissements, ballonnements), de troubles respiratoires (broncho-pneumonies lors de la migration des larves L₂ dans les poumons).

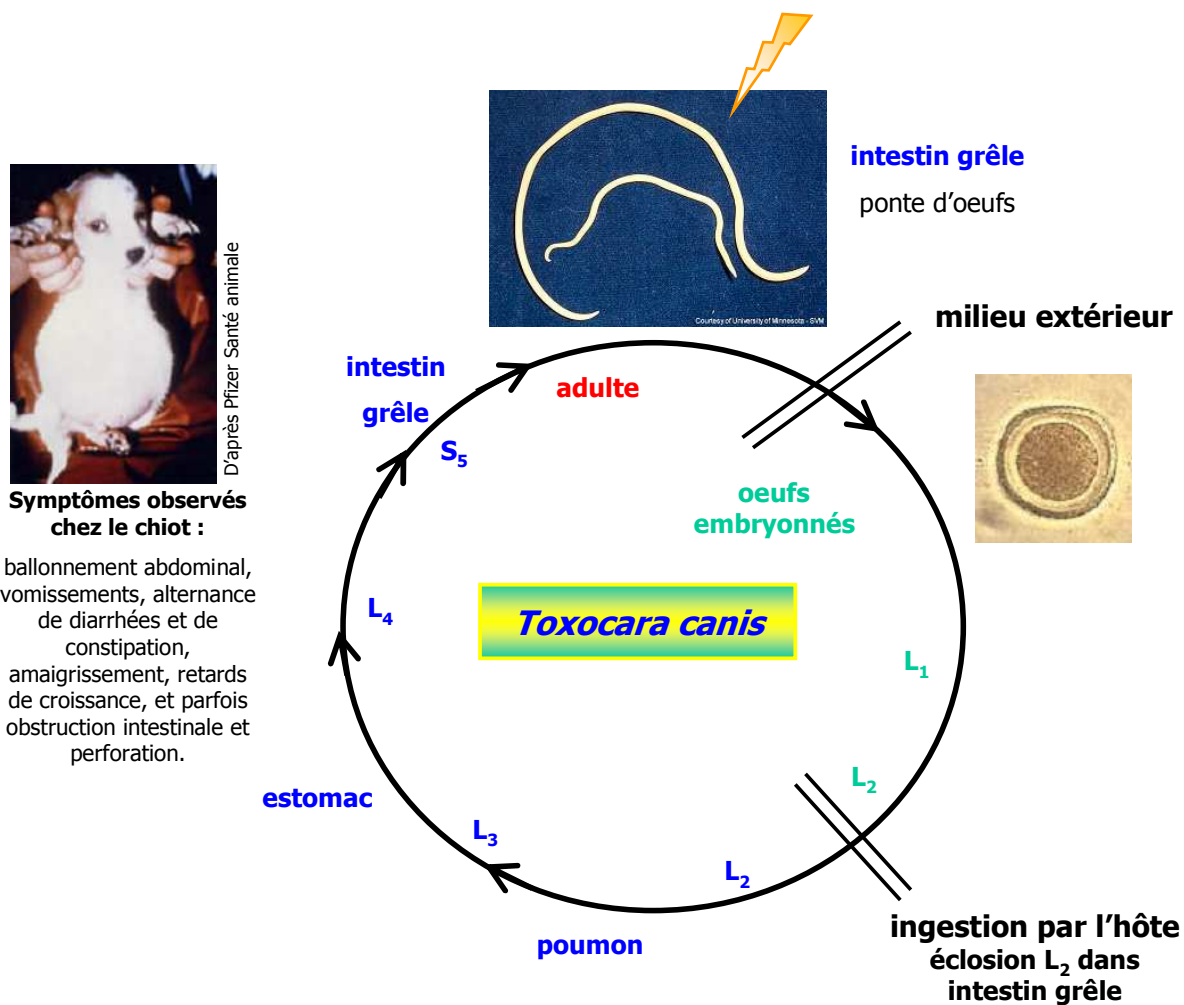


Figure 14. Cycle de développement de *Toxocara canis*

Il existe deux formes de cette parasitose :

La première forme est l'ascaridose imaginaire caractérisée principalement par un syndrome entéritique (chiots présentant une baisse de croissance), pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal par occlusion intestinale ou par choc toxémique.

La seconde forme est l'ascaridose larvaire ou microascaridose à l'origine d'une bronchopneumonie lors de la mue des larves L₂ dans les poumons.

Les tests *in vivo* ont mis en évidence une forte réduction du nombre d'œufs de *Toxocara canis* excrétés dans les selles (respectivement - 99,6%, - 99,9%, - 99,6% après une, deux ou trois applications de selamectine (Stronghold®) à 6 mg/kg à un mois d'intervalle) et du nombre d'adultes présents dans l'intestin (respectivement - 98,1%, - 98,6%, - 100% après une, deux ou trois applications de Stronghold® à 6 mg/kg à un mois d'intervalle) [64].

NB : La toxocarose est une zoonose. En terme de santé publique, les jeunes enfants sont les plus exposés, en particulier dans la tranche d'âge de un à quatre ans où ils portent de nombreuses choses à leur bouche et ne se lavent pas les mains. La contamination se fait par les œufs d'ascarides éliminés dans les déjections de chiens, par exemple dans les bacs à sable, ou au contact de chiots dans le pelage desquels se trouvent des œufs embryonnés.

*Les chats infestés par *Toxocara cati* jouent aussi un rôle épidémiologique important.*

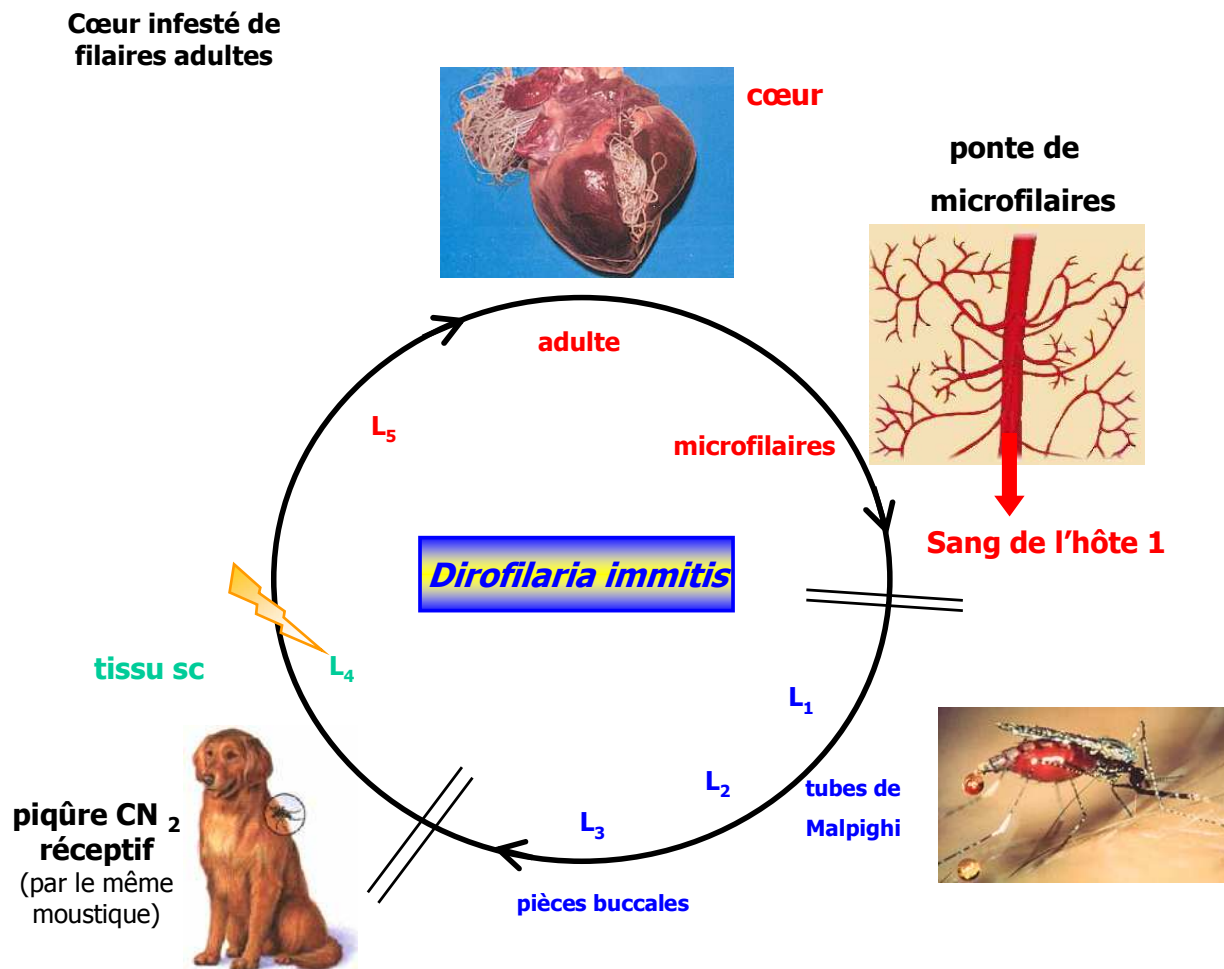


Figure 15. Cycle de développement de *Dirofilaria immitis*



Stades sur lesquels la selamectine est efficace :

- larves L₄ [6]

Photos et images tirées des sites web suivants :

- www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/dirofilaria.html
- www.funkstownvet.com/buginfo.html
- www.tinymosquito.com/dogheartworm.html
- cal.vet.upenn.edu/merial/Introduction/intro_2.htm

2.5. Prévention de la dirofilariose (Figure 15) [35]

La dirofilariose est due à *Dirofilaria immitis*. Ce parasite, qui a pour hôte intermédiaire le moustique, est principalement responsable d'un syndrome cardio-pulmonaire chez le chien infecté.

Le ver se présente sous plusieurs formes. La première est la forme microfilaire qui représente un stade larvaire du nématode ; il peut vivre jusqu'à deux ans dans la circulation sanguine du chien, mais ce ver immature a besoin de son hôte intermédiaire pour poursuivre son cycle de vie. Suite à la piqûre du moustique, les microfilaires colonisent les tubes de Malpighi de ce dernier. Elles évoluent en larves L₃ qui infestent les pièces buccales du moustique puis un chien lors d'une nouvelle piqûre. Les microfilaires ne sont, par conséquent, pas infectieuses dans le chien (elles ne peuvent pas atteindre l'âge adulte chez cette espèce), mais elles sont tout de même sources de problèmes (obstruction des petits vaisseaux sanguins).

Une autre forme du ver est la forme filaire qui représente le stade adulte vivant de cinq à sept ans dans le cœur et les artères pulmonaires du chien infecté, où la femelle produit des millions de microfilaires. Ce stade génère des perturbations sur le fonctionnement des valvules cardiaques et sur la circulation sanguine dans les vaisseaux sanguins adjacents du cœur (formation de "bouchons" dans ces derniers).

Les essais contrôlés ont montré qu'une application unique de sélamectine (Stronghold® à 6 mg/kg) est efficace à 100% contre le développement des larves de *Dirofilaria immitis* en adultes et qu'une administration mensuelle est efficace à 100% contre l'infestation par le parasite. De plus l'administration de sélamectine (et ce, jusque trois fois la dose préconisée) sur des animaux infestés par des microfilaires et/ou des vers adultes, n'a entraîné aucune réaction secondaire du type choc ou thrombose due à la destruction des parasites comme cela a pu être observé avec d'autres avermectines [42] [64]. Cela s'explique par le fait que la sélamectine inhibe le passage du stade larvaire L₄ à L₅ [6] ; par conséquent elle ne provoque pas de destruction massive des formes adultes, d'où l'indication de la molécule dans la prévention et non dans le traitement de la dirofilariose.

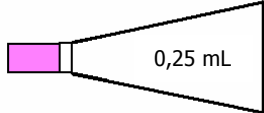
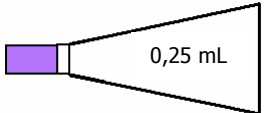
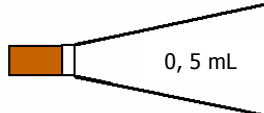
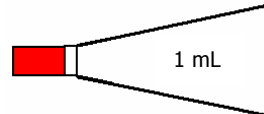
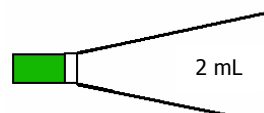
Nous venons de voir que la sélamectine possède un large spectre d'action chez le chien mais l'AMM du Stronghold® autorise également une utilisation chez le chat.

2.6. Utilisation spécifique de la sélamectine chez le chat [64] [65]

Chez le chat le Stronghold® est préconisé dans le traitement et la prévention des infestations par les puces dues à *Ctenocephalides spp* pendant un mois après l'administration en dose unique du médicament.

Dans les infestations plus spécifiques au chat, la sélamectine peut être utilisée dans le traitement de la gale des oreilles due à *Otodectes cynotis*, le traitement des infestations par les poux broyeures dues à *Felicola subrostratus*, le traitement des ascaridoses intestinales dues aux formes adultes des ascarides (*Toxocara cati*) [57] et le traitement des ankylostomidoses intestinales dues aux formes adultes des ankylostomes (*Ancylostoma tubaeforme*) [64] [65].

Tableau 5. Différentes présentations « spot-on » du Stronghold®

Poids du chien (kg)	Dose de sélamectine préconisé (mg)	Concentration de la solution (mg/mL)	Couleur du tube correspondant
≤ 2,5	15	60	 0,25 mL rose
2,6 à 5,0	30	120	 0,25 mL violet
5,1 à 10,0	60	120	 0,5 mL marron
10,1 à 20,0	120	120	 1 mL rouge
20,1 à 40,0	240	120	 2 mL vert
> 40	6 mg/kg	60 / 120	association appropriée de tubes

2.7. Modalités d'utilisation de la sélamectine en formulation tubes (Stronghold®)

Le Stronghold® est prévu pour une application externe. Il se présente sous la forme d'un "spot-on" ; le contenu d'une pipette doit être appliquée directement sur la peau en écartant bien les poils de l'animal. La localisation préférentielle se situe à la base du cou, en avant des omoplates, afin d'éviter un éventuel léchage du produit par l'animal.

La dose recommandée est de 6 mg/kg en administration unique, une dose complète correspondant au contenu d'un tube. Il existe plusieurs présentations (Tableau 5) allant du Stronghold® 15 mg au Stronghold® 240 mg adaptées aux formats des différentes races. L'application peut néanmoins être répétée selon la parasitose considérée et selon que l'on envisage la prévention et/ou le traitement de celle-ci.

Pour la prévention des infestations de puces chez l'animal et dans son environnement, le médicament doit être administré tous les mois. Dans le programme thérapeutique contre la DAPP, l'application doit également être mensuelle.

Pour la prévention de la dirofilariose, le médicament peut être appliqué mensuellement toute l'année ou alors au moins un mois après la première exposition de l'animal aux moustiques et jusqu'à un mois après la fin de la période d'exposition. Le traitement des infestations par les poux broyeurs et celui des ascaridoses consistent en une administration unique de Stronghold®.

L'élimination complète des sarcoptes, agents de la gale, nécessite deux applications à un mois d'intervalle.

Après application cutanée, la sélamectine est absorbée localement et distribuée par voie systémique. Un stockage au niveau des glandes sébacées explique la persistance de la molécule dans l'organisme. L'élimination, essentiellement fécale, est lente. La combinaison de ces deux derniers phénomènes explique le maintien de concentrations plasmatiques actives, entre deux applications de Stronghold® à un mois d'intervalle (à la dose de 6 mg/kg).

2.8. Influence du sexe de l'animal sur l'utilisation de la sélamectine

L'efficacité d'un médicament est directement liée à sa biodisponibilité dans l'organisme traité. Celle-ci est elle-même influencée par plusieurs facteurs comme l'ont démontré Mc Kellar et Benchaoui en 1996 [33].

Les études pharmacocinétiques menées sur les avermectines et les milbémycines chez les animaux de compagnie ont décrit l'influence de paramètres comme la dose, la formulation et la voie d'administration.

Peu d'études cependant ont été entreprises sur l'influence du sexe. En 1998, Mugford et Kedderis [41] se sont servis du rat comme modèle d'étude de l'influence du sexe sur le métabolisme de différents xénobiotiques. Ils ont démontré alors que les paramètres pharmacocinétiques d'une molécule administrée sont significativement différents selon que l'animal soit un mâle ou une femelle.

En 2000, l'équipe de Pillai [47] a réalisé une étude de l'influence du sexe de l'animal sur la pharmacocinétique de la sélamectine. Des divergences intra- et interspécifiques liées au sexe ont été mises en évidence. Après une administration par voie orale, la disponibilité plasmatique de la sélamectine (en terme de C_{max} et AUC : Cf partie II) est, dans leur étude, plus importante chez chiens mâles et les rattes que respectivement chez les chiennes et les rats mâles.

Au vu de ces résultats, nous avons trouvé un grand intérêt à poursuivre ces investigations dans le cadre d'une étude pharmacocinétique conduite en collaboration avec l'équipe du Dr M. Alvinerie à l'INRA de Saint Martin du Touch (31) et celle du Pr M. Franc (UMR 181) de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Cette étude traite de la biodisponibilité plasmatique de la sélamectine selon le sexe du chien, en vue d'une éventuelle application thérapeutique.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Notre travail a consisté, dans un premier temps, à traiter des chiens avec un spot-on de sélamectine (à la dose de 6 mg/kg) et à leur prélever du sang selon un calendrier prédéfini. Dans un deuxième temps, nous avons comparé les profils pharmacocinétiques de la sélamectine dans le plasma de chiens mâles et de chiens femelles.

Cette étude a eu pour but de caractériser la biodisponibilité plasmatique de la sélamectine en fonction du sexe de l'animal, après une application topique chez le chien.

Tableau 6. Caractéristiques des animaux intégrés à l'expérimentation.

Désignation des animaux	Sexe	Date de naissance	Poids (en kg)
968	MALES	30/05/92	12,91
PXE 191		09/08/93	12,94
PVK 501		10/06/93	13,50
PVK 506		09/08/93	13,54
LNR 764		06/01/92	13,79
872	FEMELLES	01/02/91	16,40
OHJ4		13/08/90	12,02
PVK 500		10/06/93	18,16
PRY 567		02/11/92	14,70
693		12/10/89	12,22

Tableau 7. Calendrier des prélèvements sanguins sur les 10 animaux listés dans le tableau 6.

Mardi	10/10/00	T0*	4h	8h	12h
Mercredi	11/10/00	24h	36h		
Jeudi	12/10/00	48h			
Vendredi	13/10/00	3 j			
Samedi	14/10/00	4 j			
Lundi	16/10/00	6 j			
Mercredi	18/10/00	8 j			
Vendredi	20/10/00	10 j			
Lundi	23/10/00	13 j			
Mercredi	25/10/00	15 j			
Lundi	30/10/00	20 j			
Samedi	04/11/00	25 j			
Jeudi	09/11/00	30 j			
Mardi	14/11/00	35 j			

* T0 est définie comme la date du premier prélèvement qui précède l'application du spot-on de sélamectine.

I. MATERIEL ET METHODES

1.1. La phase animale

Dix chiens Beagle, cinq mâles et cinq femelles non parasités, ont été traités par une dose de 6 mg/kg (équivalent à 0,05 mL/kg) de Stronghold 240[®] en spot-on (tableau 6).

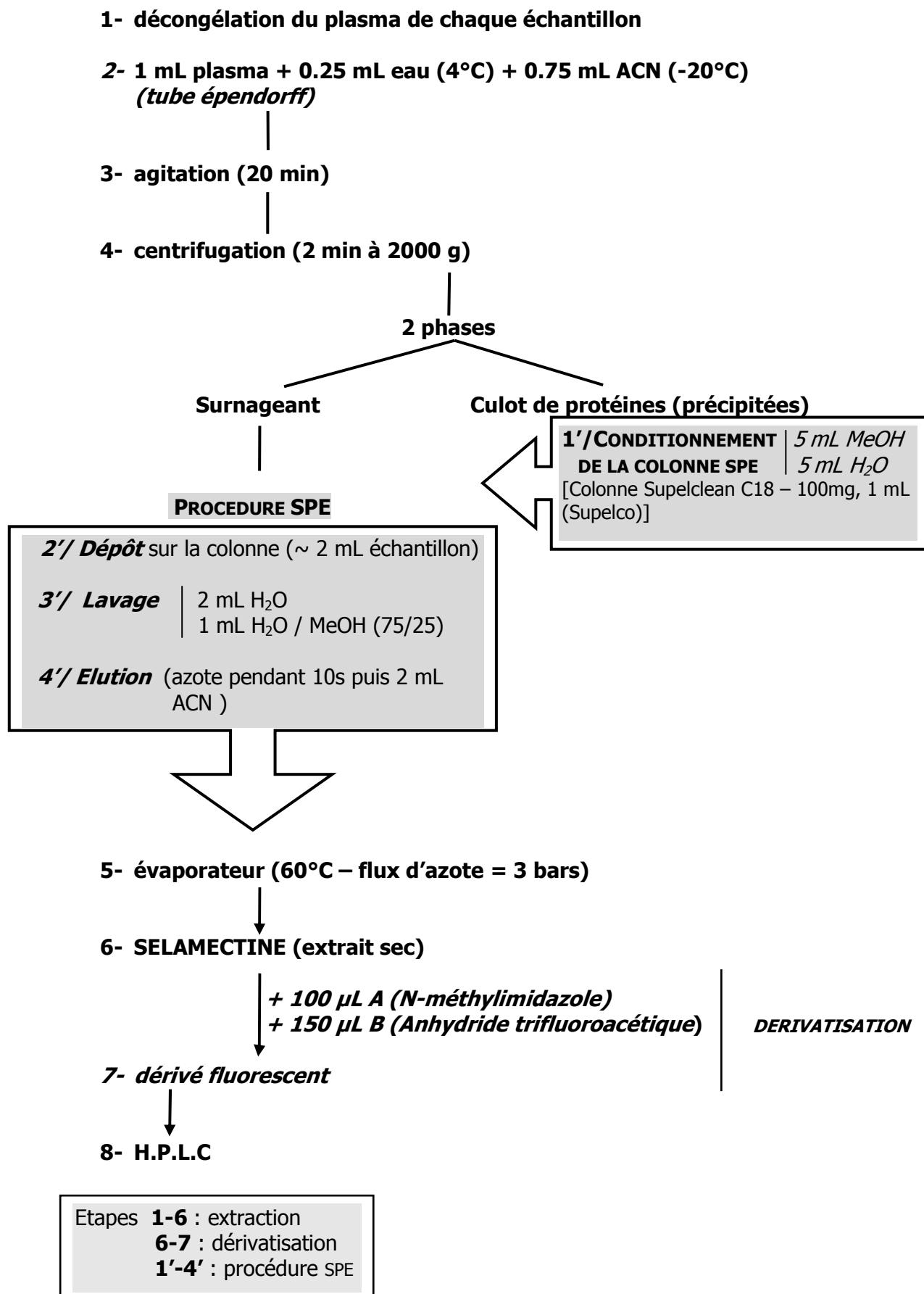
On a ensuite réalisé des prises de sang sur EDTA sur ces dix animaux, à des dates définies (tableau 7). Le suivi pharmacocinétique se déroule sur 14 jours avec 18 points d'étude (18 prises de sang par animal au total).

Le sang a ensuite été centrifugé 10 minutes à 2500 tours/min, ce qui nous a permis de récupérer le plasma (surnageant) que nous avons congelé à -18°C en attendant les étapes analytiques de la phase suivante (extraction, purification, chromatographie).

1.2. La phase analytique : généralités

La phase analytique a été réalisée "en aveugle" : chaque animal étant uniquement caractérisé par un code à base de chiffres et/ou de lettres, il nous a été impossible de connaître le sexe d'aucun chien jusqu'à la dernière analyse.

Figure 16. Schéma général de la phase analytique.



1.2.1. L'extraction et la purification de la molécule étudiée (Figure 16)

Cette première phase de l'analyse a été réalisée sur les échantillons de plasma que nous avons décongelés animal par animal. L'objectif était de recueillir la sélamectine présente dans les échantillons sous la forme d'extraits purs.

La purification de la sélamectine a été obtenue par une procédure d'extraction en phase solide (SPE).

- Le principe de base de la SPE est celui de la chromatographie en phase liquide : dans cette dernière, on freine simplement la migration des diverses familles de molécules en les retenant sélectivement sur un adsorbant ; en SPE on bloque totalement les molécules sur l'adsorbant et on les élue brutalement et sélectivement en les décrochant du support par un solvant spécifique. En pratique, il s'agit d'un jeu d'élution-lavage au méthanol sur colonne.

- L'extraction a été réalisée en présence d'acétonitrile qui a pour but de faire précipiter les protéines présentes dans chaque échantillon de plasma recueilli.

Une fois les protéines précipitées, on a transféré manuellement le surnageant dans des tubes destinés à l'automate de purification par SPE, le Benchmate II (Zymark, Hopkinton, MA, USA) qui est programmé pour réaliser les différentes étapes d'élution-lavage. Un cycle dure 22,3 minutes.

- La colonne d'élution a tout d'abord été conditionnée par le passage de 5 mL méthanol suivi de 5 mL d'eau dont le débit était $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Ensuite le surnageant récupéré à l'étape précédente est passé à une vitesse de $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le cycle s'est poursuivi par un premier lavage de la colonne par 2 mL d'eau puis par 1 mL d'un mélange eau / éthanol (75% / 25%) à $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Enfin, un flux d'azote est passé dans la colonne durant 10 secondes et un rinçage ultime avec 2 mL d'acétonitrile à $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a permis de récupérer l'éluat qui a ensuite fait l'objet de l'analyse par HPLC.

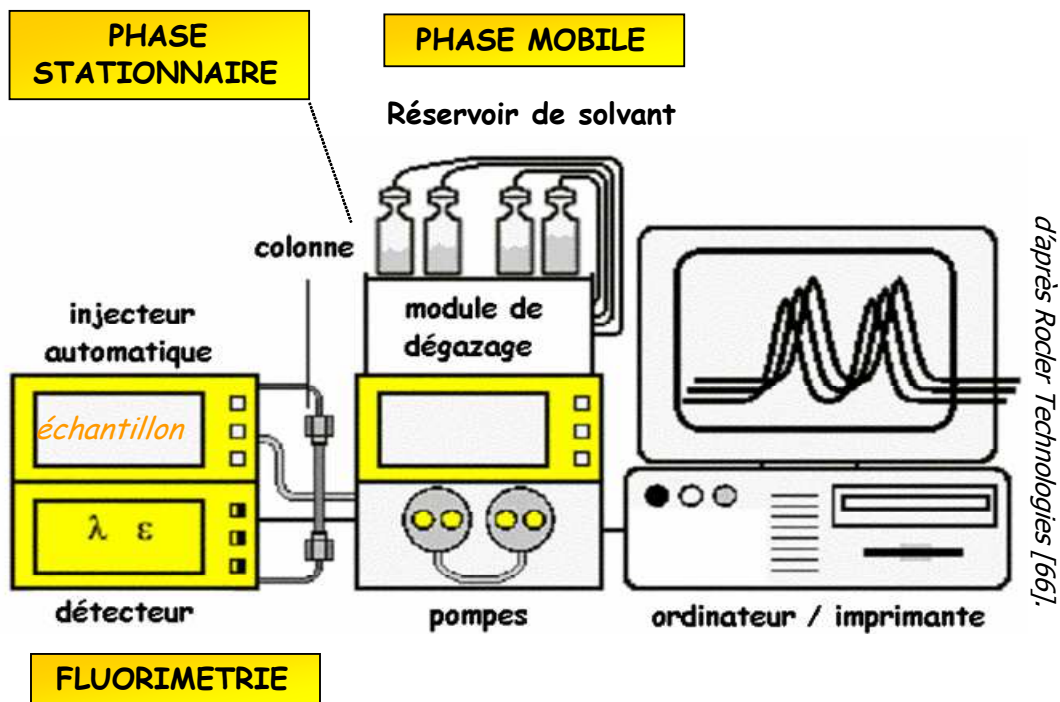
1.2.2. L'évaporation et la dérivation du produit extrait (Figure 16)

- Les conditions de l'évaporation ont été telles que le produit extrait n'a jamais été au contact de molécules d'eau afin de garantir la réaction de dérivation : pour cela, elle a été réalisée au bain-marie à 60°C sous atmosphère enrichie en azote (sous un flux de 3 bars).

- La dérivation a rendu la sélamectine fluorescente grâce à deux réactifs : en premier lieu le N-méthyl-imidazole qui reprend l'extrait sec issu de l'évaporation et ensuite l'anhydride trifluoroacétique qui est le réactif rendant le composé fluorescent. Les deux réactifs (N-méthyl-imidazole et l'anhydride trifluoroacétique) ont été obtenus par dilution des produits purs dans l'acétonitrile : un volume de N-méthyl-imidazole pour un volume d'acétonitrile et un volume d'anhydride trifluoroacétique pour deux volumes d'acétonitrile.

Nous avons remis en solution l'extrait sec par 100 µL de N-méthyl-imidazole. La réaction de dérivation a ensuite été induite par l'addition de 150 µL d'anhydride trifluoroacétique : après une courte agitation (moins de 30 secondes) la solution obtenue a été transférée dans un tube en verre teinté placé immédiatement à l'obscurité afin d'éviter une photosensibilisation (plus précisément une photoisomérisation) du dérivé fluorescent obtenu très sensible aux rayons ultraviolets.

L'analyse par HPLC devait ensuite avoir lieu dans les six heures afin d'éviter une dégradation du dérivé fluorescent de la sélamectine.



= mesure de l'énergie de fluorescence d'un soluté excité par une radiation UV pour une molécule fluorescente (naturellement ou après dérivatisation)

Figure 17. Schéma d'un appareil à chromatographie en phase liquide (HPLC) [66].

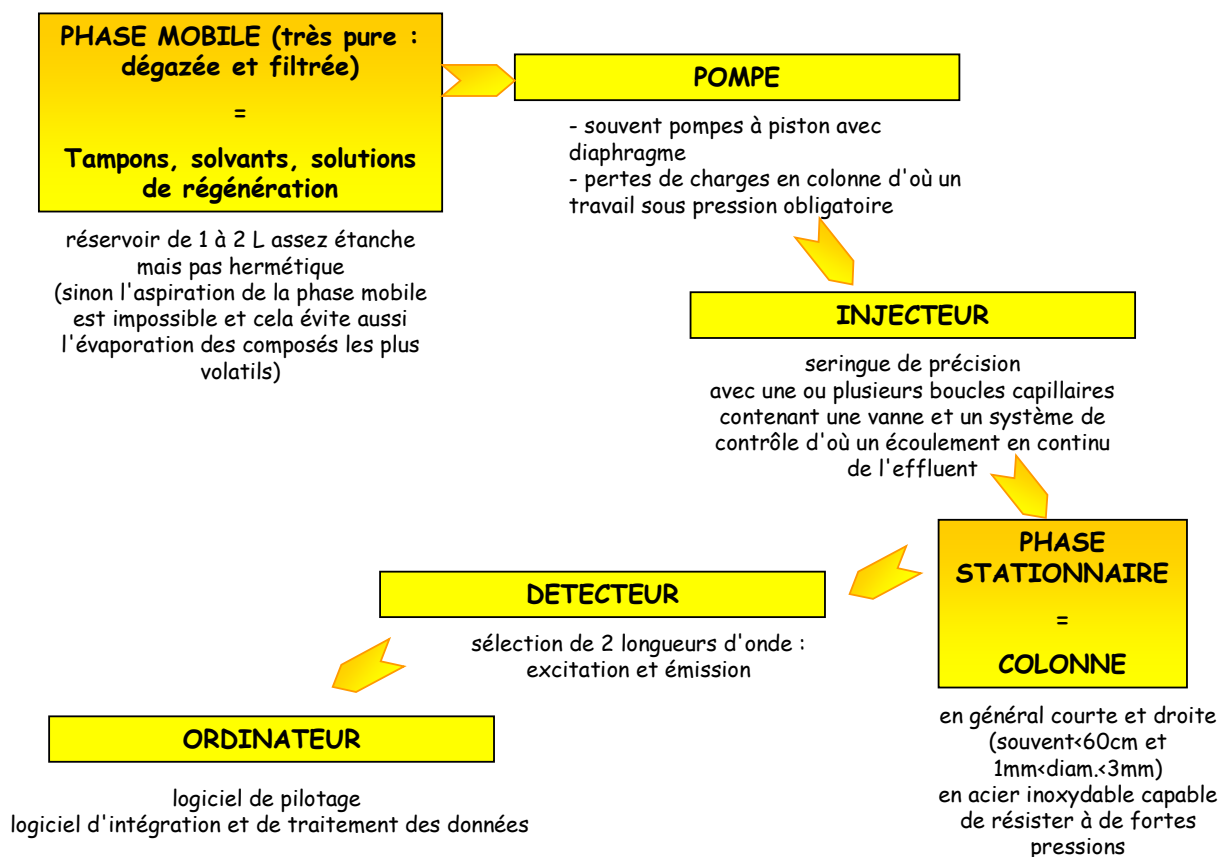


Figure 18. Schéma de principe de l'HPLC.

1.2.3. La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

L'HPLC nécessite l'utilisation d'un ordinateur qui contrôle le fonctionnement d'un appareillage relativement lourd (Figures 17 et 18) :

La pompe 420 (Kontron, Paris, France) :

C'est une pompe débit métrique à débit constant (1,4 mL/min). Le solvant est dégazé (ceci permet d'éviter la formation de bulles à l'aspiration) et filtré.

Le débit doit être constant afin d'assurer un temps de rétention régulier.

L'injecteur auto sampler 360 (Kontron, Paris, France):

Il permet d'introduire l'échantillon à traiter dans le système chromatographique. Le volume d'injection est 100 µL.

La colonne C18 (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) :

Les phases stationnaires sont généralement constituées de deux matériaux :

- la silice
- (les polymères synthétiques.)

La silice est le support le plus utilisé ; ses caractéristiques de base sont importantes :

a/ Forme et taille des particules : sphériques ou irrégulières

Les particules de silice irrégulières sont peu à peu abandonnées en analytique : la distribution en taille des particules est aussi resserrée que possible mais on n'atteint jamais 100%.

b/ Surface spécifique

Elle représente le nombre de sites actifs disponibles au niveau de la silice. Elle est exprimée en m²/g de silice.

c/ Diamètre des pores

Le support unitaire est un "grain". Il est important que le soluté pénètre à l'intérieur de ce "grain" de silice afin d'augmenter les interactions entre soluté et phase stationnaire. La taille des pores varie entre 4 et 300 Å.

d/ Caractéristiques de la colonne utilisée

La colonne contient la phase stationnaire (Supelcosil C₁₈, 5µm) qui est un gel de silice greffé à 18 atomes de carbone ("C₁₈") ; le diamètre des particules est de 5 µm. La colonne est en inox, sa longueur est 25 cm ; son diamètre interne est 4,6 mm, le diamètre des particules de silice est 5 µm. La forme des grains est sphérique ; leur porosité est 100 A°. La surface est 170 m²/g.

A titre de comparaison, voici les temps de rétention de plusieurs endectocides dans la colonne :

MOXIDECTINE 8,32 min	SELAMECTINE 9,67 min	DORAMECTINE 15,61 min	IVERMECTINE > 30 min
-------------------------	---------------------------------------	--------------------------	-------------------------

En pratique, cela signifie que sur un échantillon inconnu contenant un (ou plusieurs) endectocide(s), la molécule détectée 9,67 minutes après son injection dans la colonne, ne peut être que la sélamectine.

Le solvant d'éluion :

Il constitue la phase mobile et est constitué d'acide acétique (18 mL ; en solution dans l'eau à 0,4%), d'acide heptane-sulfonique (2 mL ; en solution aqueuse), de méthanol (200 mL) et d'acétonitrile (QSP 500 mL).

Le détecteur FP-920 (Jasco, Tokyo, Japon) :

C'est un spectrofluorimètre connecté à un poste Kroma System 2000 (Kontron, Paris, France).

- Le détecteur doit donner une réponse proportionnelle à la concentration de la molécule présente dans l'échantillon : lorsqu'un composé est fluorescent, il réémet sous forme de lumière tout ou partie du rayonnement de la source excitatrice auquel il est soumis. Dans notre étude, la longueur d'onde d'excitation est 355 nm et la longueur d'onde d'émission est 465 nm.

La sélamectine n'étant pas naturellement fluorescente, on lui a fait subir une réaction de dérivation (Cf 1.2.2. et Figure 16). L'intensité de fluorescence enregistrée ensuite au cours du dosage (Cf 1.2.3. et Figure 16) est proportionnelle à la concentration en sélamectine de l'échantillon.

- Le détecteur doit également être sensible et être stable dans le temps.
- L'ordinateur est doté d'un logiciel de pilotage du système chromatographique et d'un logiciel d'intégration et de traitement des données (Figures 17 & 18).

Au bilan, l'HPLC était tout indiquée dans notre étude car elle permet d'optimiser les qualités de la chromatographie : (i) de très petites quantités de matériel peuvent être analysées [60], (ii) la sensibilité est extrême, (iii) elle possède un grand pouvoir séparateur, (iv) elle présente une excellente reproductibilité.

1.2.4. Intérêts de la phase analytique

a/ Nature des valeurs données par l'HPLC

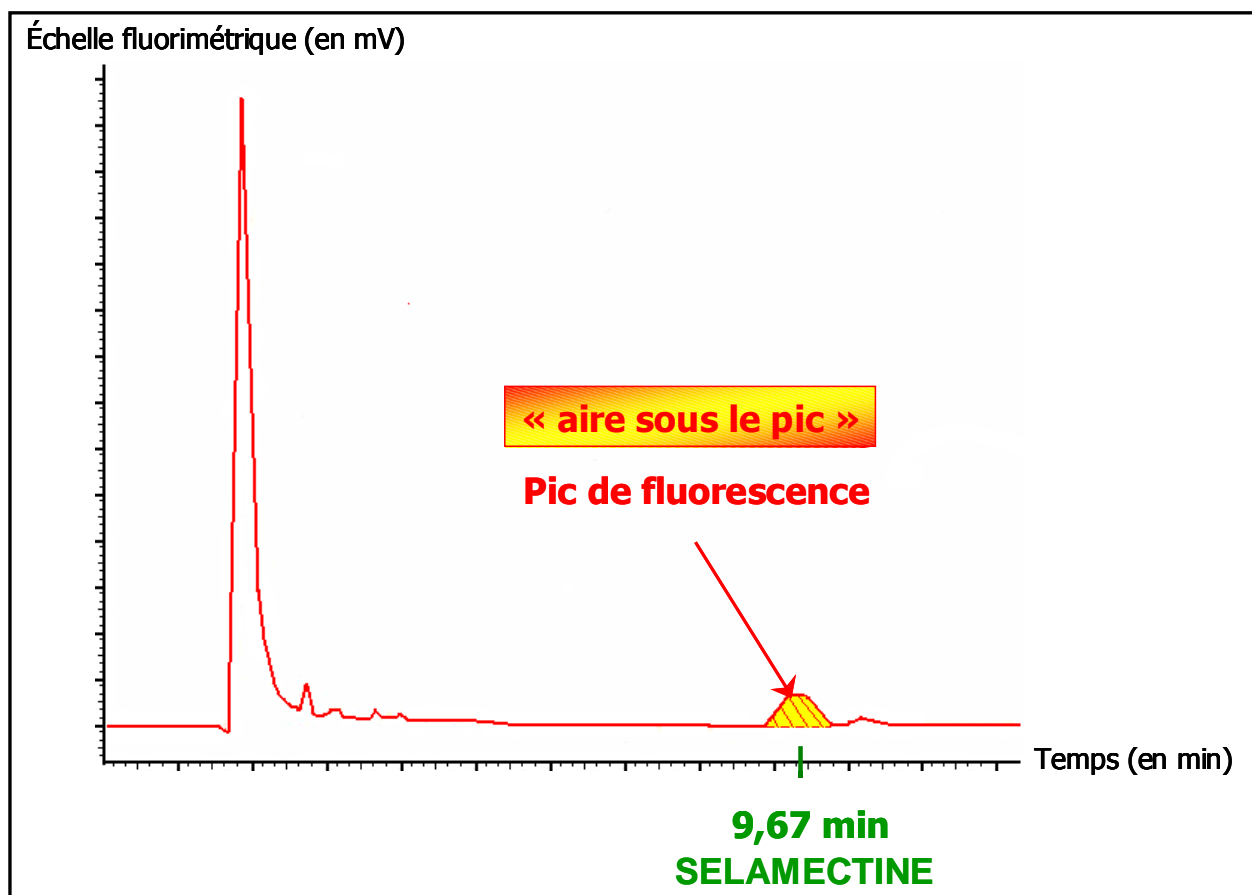
Une question récurrente se pose dans différents domaines de la biologie :

« Comment varie telle variable en fonction de telle autre variable ? ».

C'est la question que nous nous sommes posée dans cette étude pharmacocinétique, dans les termes suivants :

« Comment varie la concentration plasmatique de la sélamectine dans le temps selon que le chien soit un mâle ou une femelle ? »

Lors d'une analyse d'échantillons par HPLC, le logiciel de traitement des données traduit la quantité de fluorescence émise par l'échantillon en "aire sous le (du) pic" de fluorescence. Pour convertir les aires du pic obtenues en concentrations plasmatiques, il faut employer une gamme d'étalonnage : celle-ci permet d'établir une corrélation entre une concentration connue en sélamectine et une aire sous le pic fournie par le système fluorimétrique.



Dosage par HPLC : Détection d'une molécule fluorescente à 9,67 minutes ;
il s'agit de la sélamectine

b/ Principes généraux d'une gamme étalon

Nous sommes toujours dans le cadre de la question posée au paragraphe précédent : « Comment varie telle variable en fonction de telle autre variable ? ».

Dans le cas le plus simple, l'une des variables (généralement désignée par la lettre x) ne prend que des valeurs choisies *a priori* par le manipulateur, et l'autre variable (habituellement notée y) est aléatoire. C'est le principe que nous avons utilisé pour réaliser une gamme étalon. En effet, l'HPLC nous donne des valeurs d'aires du pic de fluorescence pour chaque échantillon analysé. La méthode de choix pour convertir ces valeurs en concentrations plasmatiques de sélamectine est l'utilisation d'une gamme étalon.

Dans ce but, nous avons fixé les concentrations en sélamectine (= x) et nous avons observé les variations de l'aire sous le pic (= y).

La relation la plus simple entre x et y que nous puissions trouver, est un modèle linéaire représenté par une ligne droite : c'est ce que nous appelons la régression linéaire simple ("simple" car il n'y a qu'une variable qui varie selon le choix du manipulateur). Ce modèle s'écrit sous la forme suivante :

$$y = ax + b + \varepsilon$$

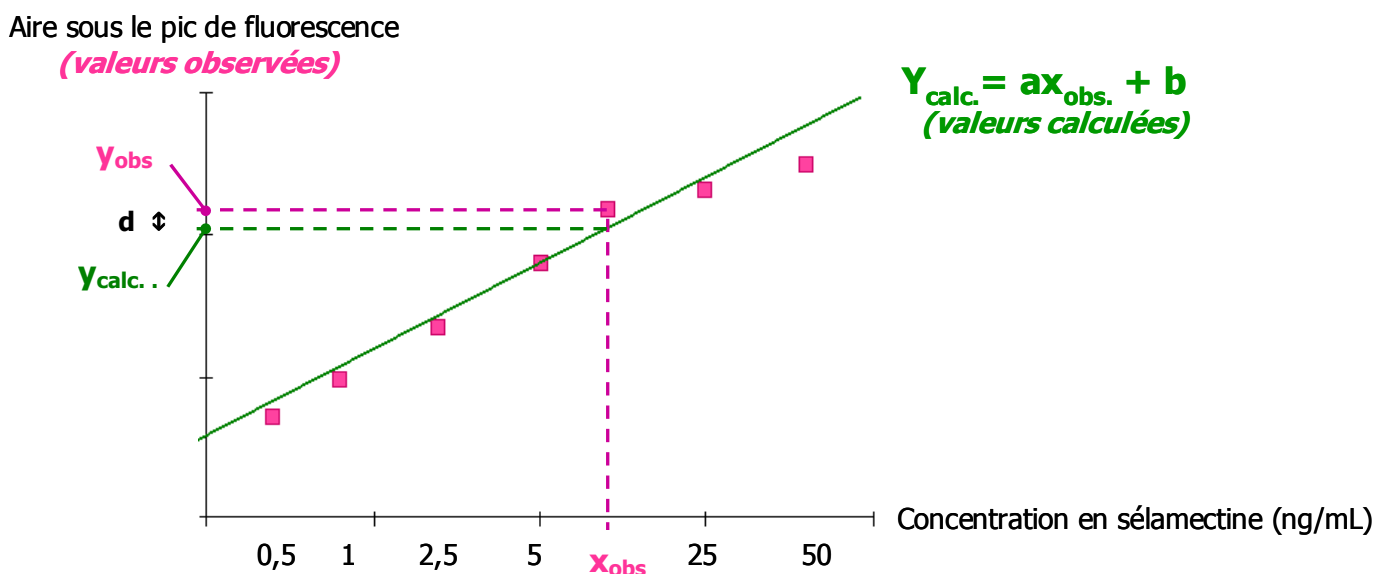
avec a la pente de la droite

b le point d'interception de la droite avec l'axe des ordonnées

ε le terme d'erreur

Lorsque nous utilisons le modèle de régression linéaire simple, nous nous retrouvons face à deux paramètres inconnus : a et b . Ce sont des paramètres de population auxquels nous n'avons pas accès. Le premier objectif est de trouver une approximation raisonnable a et b à partir d'un échantillon. Pour cela, une des méthodes utilisées est la méthode des moindres carrés : il faut chercher a et b de telle façon que la droite $y = ax + b$ soit la plus "proche" de tous les points observés (Cf graphique ci-après). La notion de "proximité" se rapporte à une façon de mesurer la distance " d " entre un point observé ($x_{\text{obs}} ; y_{\text{obs}}$) et le point d'abscisse x_{obs} qui se trouve sur la droite (son ordonnée est calculée par l'équation de la droite : $y_{\text{calc}} = ax_{\text{obs}} + b$).

Le graphique ci-dessous illustre un cas théorique de gamme d'étalonnage préparée avec sept concentrations connues de sélamectine.



A chaque concentration correspond une aire sous le pic et au final, nous obtenons un nuage de sept points qui sont regroupés autour d'une droite théorique.

d est la distance entre le point de coordonnées ($x_{\text{obs}} ; y_{\text{obs}}$) et le point de même abscisse situé sur la droite d'équation $y_{\text{calc}} = ax_{\text{obs}} + b$:

$$d^2 = [y_{\text{obs}} - (ax_{\text{obs}} + b)]^2$$

d^2 est le carré de la distance qui sépare deux points (Cf graphique ci-dessus). Nous disposons de sept points : il faut construire un indice qui mesure la distance entre les sept points mesurés et leurs points correspondants sur la droite. La distance utilisée, ou plutôt son carré, est en général notée SCE pour somme des carrés des écarts et vaut :

$$SCE = \sum_{\text{obs}=1 \text{ à } 7} [y_{\text{obs}} - (ax_{\text{obs}} + b)]^2$$

Les paramètres a et b sont calculés de façon à rendre la SCE minimale.

En dérivant la SCE par rapport à a et b, nous obtenons :

$$\bar{a} = \frac{\sum_{\text{obs}=1 \text{ à } 7} (x_{\text{obs}} - \bar{x}) - (y_{\text{obs}} - \bar{y})}{\sum_{\text{obs}=1 \text{ à } 7} (x_{\text{obs}} - \bar{x})}$$

et $\bar{b} = \bar{y} - \bar{a} \bar{x}$

avec \bar{x} la moyenne des x_{obs} et \bar{y} la moyenne des y_{obs} ;

et les symboles \bar{a} et \bar{b} signifient que ce ne sont pas les valeurs des paramètres de population a et b mais des estimations de ces valeurs.

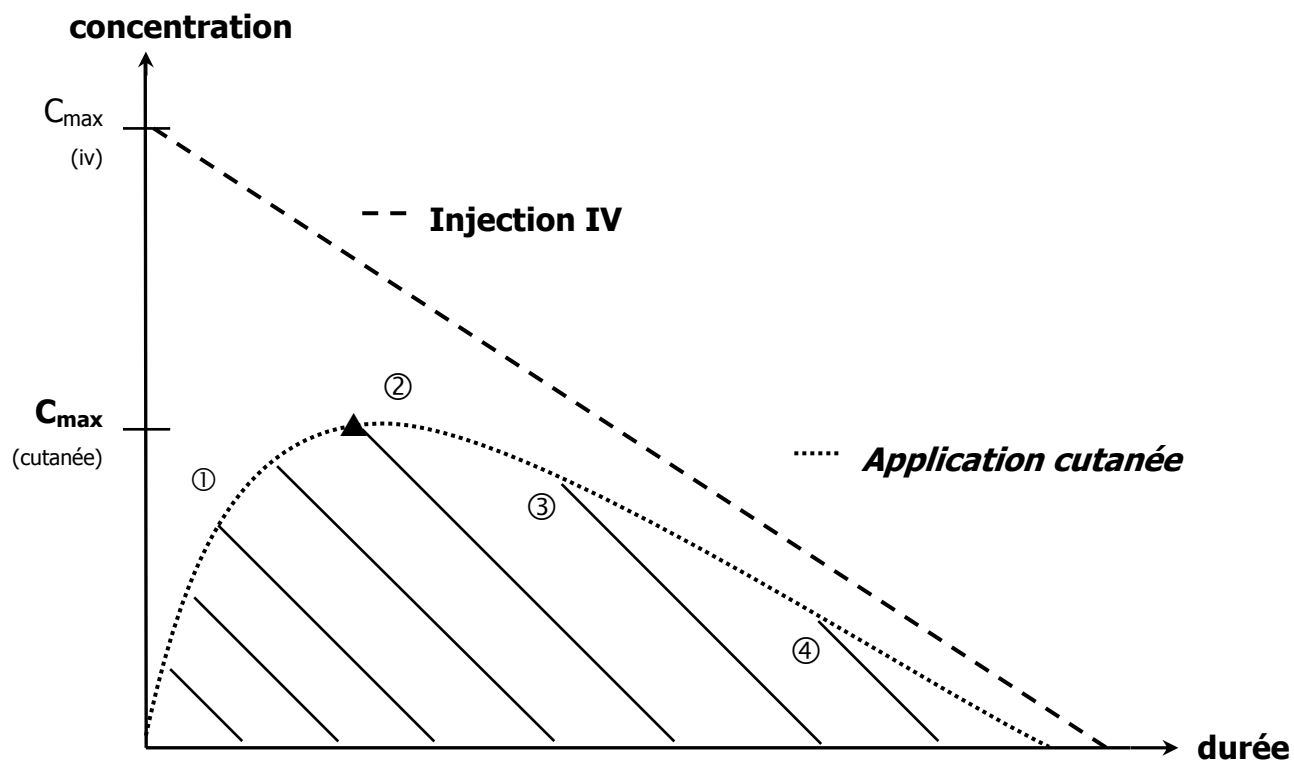
La variable x a été pondérée en $1/x^2$ (la pondération consiste en l'affectation d'un coefficient à une donnée statistique pour en refléter l'importance réelle dans un échantillon).

Nous avons également pris la précaution d'utiliser un standard interne aussi bien pour la réalisation de la gamme étalon que dans l'analyse des différents échantillons. Ceci nous a servi à vérifier que tous les tubes étaient préparés de façon homogène : le standard interne est en quelque sorte un "mouchard" de la qualité du travail du manipulateur. Tous nos résultats d'analyse ont pris en compte ce standard interne dans le calcul du rapport "R" suivant :

$$R = \text{Aire du pic}_{[\text{sélamectine}]} / \text{Aire du pic}_{[\text{Standard interne}]}$$

La droite de régression de la gamme étalon représente R (y) en fonction de la concentration en sélamectine (x).

Figure 19. Schéma théorique d'un suivi pharmacocinétique de la concentration plasmatique d'un principe actif après une administration IV ou une application cutanée (spot-on).



Après une application cutanée, on peut observer les quatre phases suivantes :

- ① *phase d'absorption*
- ② *phase de distribution*
- ③ *phase de métabolisation*
- ④ *phase d'élimination*

 *aire sous la courbe (AUC) après application cutanée.*

1.3. Pharmacocinétique : théorie et définition.

1.3.1. Principe d'obtention des paramètres pharmacocinétiques.

La pharmacocinétique est fréquemment utilisée pour décrire l'évolution de la concentration plasmatique d'un médicament dans le temps ; celle-ci dépend de l'action, en quatre phases, de l'organisme sur le principe actif : l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination. Une administration intraveineuse conduit immédiatement à une concentration plasmatique maximale du principe actif : il n'y a pas de phase d'absorption (Figure 19).

A partir de la courbe de suivi de la concentration du principe actif en fonction du temps, plusieurs paramètres pharmacocinétiques peuvent être définis :

(i) La concentration maximale (C_{max})

C'est la concentration plasmatique maximale relevée durant l'étude cinétique.

(ii) Le temps maximal (T_{max})

C'est le temps nécessaire pour atteindre la C_{max} .

(iii) L'aire sous la courbe (AUC) : un paramètre d'exposition

Elle est représentée par la surface sous-tendue par la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps. Elle exprime le niveau d'exposition de l'organisme au médicament (figure 19).

(iv) Le temps de demi-vie plasmatique

Il s'agit du temps nécessaire pour que les concentrations plasmatiques soient divisées par deux lorsque l'équilibre de distribution est obtenu : il ne peut donc être calculé qu'à partir de la phase terminale de la courbe des concentrations plasmatiques.

(v) Le temps moyen de résidence (MRT) : un paramètre de rémanence

Il se définit comme le temps moyen passé par une molécule de médicament dans l'organisme ; il prend en compte la totalité des quatre phases contrairement au temps de demi-vie.

(vi) La clairance

Elle mesure la capacité d'un organisme ou d'un organe à éliminer un médicament. Elle est spécifique à chaque molécule et son calcul nécessite une administration intraveineuse. Au sens toxicologique du terme, c'est la fraction du débit sanguin traversant un organe qui sera totalement débarrassée du médicament.

(vii) La biodisponibilité

Elle mesure le pourcentage du médicament qui, après absorption, atteint la circulation générale. La voie intraveineuse, générant une biodisponibilité de 100%, est une voie d'administration de référence. Ainsi, si nous nous reportons à la figure 19, la biodisponibilité du médicament administré par voie cutanée est définie par la formule suivante :

$$\text{Biodisponibilité} = \frac{\text{AUC}_{\text{cutanée}}}{\text{AUC IV}}$$

Il est également possible de calculer une biodisponibilité relative : elle mesure des quantités relatives du médicament chez un même individu pour lequel nous voudrions comparer deux formes pharmaceutiques du médicament ou deux voies d'administration.

(viii) La bioéquivalence

Deux formulations pharmaceutiques sont dites équivalentes lorsque nous pouvons démontrer statistiquement leurs similitudes pharmacocinétiques. Ceci a une application clinique : deux formulations bioéquivalentes sur le plan pharmacocinétique sont considérées comme équivalentes sur le plan thérapeutique. La connaissance de ce paramètre peut donc être très important dans le choix de protocoles thérapeutiques.

1.3.2. Modélisation pharmacocinétique.

Le système chromatographique nous a fourni des données en terme de fluorescence émise par la sélamectine présente dans chaque échantillon (aire du pic). Pour rendre ces résultats exploitables en terme de concentrations en sélamectine, nous avons utilisé le programme d'analyse informatique MULTI développé par Yamaoka *et al.* [67] après avoir défini le modèle de notre étude :

- Après l'administration en spot-on d'un principe actif, ce dernier diffuse sur toute la surface corporelle *via* le film lipidique de la peau et rejoint en partie la circulation générale. Si l'état d'équilibre entre le plasma et les tissus est atteint instantanément, la cinétique de la molécule peut être représentée par un modèle à un compartiment unique où seule la phase d'élimination est "visible". Le phénomène n'est en réalité jamais instantané mais, dans bien des cas, cet équilibre s'effectue assez rapidement pour que le temps de distribution tissulaire soit considéré comme nul.

Ce modèle monocompartimental est alors suffisant pour quantifier les paramètres pharmacocinétiques nécessaires à une adaptation thérapeutique rigoureuse. C'est ce modèle que nous avons donc utilisé pour analyser nos résultats.

- Le programme d'analyse (MULTI) s'appuie sur l'équation qui décrit l'évolution des concentrations en fonction du temps :

$$C_t = C_0 e^{-\alpha \cdot t}$$

α est la constante d'élimination.

La constante C_0 est la concentration en sélamectine à l'instant zéro, c'est-à-dire au moment de l'administration du médicament (t_0) soit quand :

$$C_0 = \frac{\text{Dose}}{V_d}$$

"Dose" est la quantité de médicament administrée (en respectant la posologie de 6mg/kg) et " V_d " est le volume de distribution du médicament dans l'organisme traité.

Lorsque la dose, le volume de distribution et la constante d'élimination α sont connus, la concentration C_t peut être calculée à tout moment (t).

L'équation $C_t = C_0 e^{-\alpha.t}$ peut être écrite sous la forme logarithmique :

$$\ln C_t = \ln C_0 - \alpha.t$$

où l'on reconnaît l'équation d'une droite du type $y = ax + b$ avec :

$$y = \ln C_t$$

$$x = t$$

a : pente de la droite = $-\alpha$ (constante d'élimination)

b : interception à l'origine = $\ln C_0$

Lors d'une administration par voie cutanée (Figure 19), il a été démontré que les équations représentant l'évolution des concentrations plasmatiques d'un médicament en fonction du temps, dans un modèle monocompartimental, sont représentées par :

$$C(t) = \underbrace{A_1 e^{-\alpha.t}}_{\textcircled{1}} - \underbrace{A_2 e^{-k_a.t}}_{\textcircled{2}}$$

① équation de la portion de la courbe qui représente l'élimination du médicament avec A_1 l'interception à l'origine de la partie de la courbe représentant l'élimination du produit en fonction du temps et α la constante de vitesse d'élimination (pente de cette partie de la courbe).

② équation de la portion de la courbe qui représente l'absorption du médicament avec A_2 l'interception à l'origine de la partie de la courbe représentant l'absorption du produit en fonction du temps et k_a la constante de vitesse d'absorption (pente de cette partie de la courbe).

Après une application cutanée, l'absorption du produit proprement dite est difficile à mesurer. Pour l'apprécier nous nous contentons de mesurer la biodisponibilité qui correspond d'une part à la fraction de la dose initiale atteignant la circulation générale et d'autre part à la vitesse à laquelle elle l'atteint.

La quantification de la biodisponibilité ne peut se faire qu'à partir d'une forme galénique de référence : nous utilisons habituellement la voie intraveineuse comme référence qui permet d'obtenir la biodisponibilité absolue.

Le facteur F de biodisponibilité est déterminé par le rapport des AUC des deux formes à comparer (dans le cas présent cutanée *versus* intraveineuse). Par définition, ces AUC représentent la quantité de médicament disponible au niveau sanguin en fonction du temps.

$$F = \frac{AUC_{\text{cut.}}}{AUC_{\text{iv}}} \times \frac{\text{Dose}_{\text{iv}}}{\text{Dose}_{\text{cut.}}}$$

où $AUC_{\text{cut.}}$ = AUC après application cutanée

AUC_{iv} = AUC après administration intraveineuse

L'AUC peut être calculée par la méthode des trapèzes qui consiste à tracer des trapèzes sous la courbe entre les points expérimentaux, calculer leur surface et effectuer la somme des aires.

La méthode mathématique permettant de calculer les AUC est l'intégrale de l'équation exponentielle décrivant l'évolution des concentrations (Cf page 77), sans extrapolation vers l'infini. Elle s'exprime en *concentration.temps*.

La clairance (Cl) et le volume de distribution (V_d) du médicament après une application cutanée sont calculés à partir du facteur F de biodisponibilité.

Il a été démontré que :

$$Cl = F \times \frac{\text{Dose}}{AUC_0} \quad ; \quad V_d = \frac{Cl}{\alpha}$$

En résumé, le programme informatique MULTI nous a permis de calculer les valeurs moyennes et leurs écarts-types (SD ou σ) de plusieurs paramètres pharmacocinétiques d'intérêt dans notre étude (Cf partie "Résultats" p 89).

Principe d'utilisation du test de Student :

Nous appelons t la différence de valeur du paramètre que nous voulons comparer dans 2 populations. La "valeur de t " calculée est comparée aux valeurs contenues dans la table du t de Student. La table du t de Student permet de déterminer le seuil de probabilité auquel correspond le t observé (en fonction du nombre de degrés de liberté correspondant).

Si la valeur absolue du t calculé est supérieure à la valeur du t de la table de Student, nous en concluons que la différence est significative. Nous considérons communément qu'une valeur de t correspondant à un seuil $p < 0,05$ ($p = 95\%$) traduit une différence significative entre les moyennes. Si $p < 0,01$ ($p = 99\%$), alors la différence est très significative.

La table du t de Student ainsi que le détail des calculs permettant l'utilisation de cette dernière sont retrouvés en annexe de ce manuscrit.

- Les résultats obtenus ont enfin été soumis au test statistique de Student grâce au programme Instat 2.01 (Graph PAD, San Diego, CA, USA).

Lorsque nous voulons comparer deux moyennes d'une variable au sein de deux échantillons, nous nous posons la question suivante :

« la différence entre la moyenne observée sur l'échantillon n°1 et la moyenne observée sur l'échantillon n°2 est-elle significative ou non? »

Le test t de Student permet de répondre à ce genre de question. Dans notre étude, la question était la suivante :

« la différence entre le profil plasmatique moyen de la sélamectine chez les chiens mâles et le profil plasmatique moyen de la sélamectine chez les chiens femelles est-elle significative ou non? »

Le test de Student est un test de significativité qui peut être employé lors de la comparaison de deux moyennes (ce test ne peut être utilisé qu'à deux conditions : les distributions des moyennes sont normales, c'est-à-dire décrivent une courbe de Gauss, et leurs variances sont de même taille).

Tableau 10. Solutions mères et gamme d'étalonnage utilisées.

Numéro de la solution mère	①	②	③
Concentration de la solution mère	10 ng / 10 µL	1 ng / µL	0,1 ng / 10 µL

Numéro de la solution étalon	Concentration de la solution étalon (en ng / mL)	Volume de solution mère utilisée (volume total = 200 µL)	Volume de Std _i * (doramectine)
G ₁	0,5	10 µL de ③	20 µL
G ₂	1	20 µL de ③	20 µL
G ₃	2,5	5 µL de ②	20 µL
G ₄	5	10 µL de ②	20 µL
G ₅	10	20 µL de ②	20 µL
G ₆	25	5 µL de ①	20 µL
G ₇	50	10 µL de ①	20 µL

*Std_i : standard interne

1.4. Phase analytique : dosage des échantillons

1.4.1. Réalisation de la gamme étalon.

La gamme d'étalonnage est constituée de sept solutions de 200 μL de sélamectine de concentration croissante. Elles sont préparées à partir de trois solutions mères de sélamectine de concentrations connues. Les valeurs des concentrations des solutions mères et de la gamme sont rapportées dans le tableau 10. Le standard interne est une solution de doramectine dont la concentration est 10 ng / 20 μL . On ajoute dans chaque tube eppendorf 20 μL de doramectine (soit 10 ng). Cette concentration est celle qui permettrait d'avoir une surcharge de doramectine dans le plasma d'un chien témoin (c'est-à-dire dans un plasma exempt de sélamectine).

Chaque tube subit ensuite les étapes analytiques décrites dans les paragraphes 1.2.1 à 1.2.3 : extraction purification par SPE, dérivation, et analyse par HPLC (Figure 16).

Prenons le cas de la gamme réalisée pour le chien 764 à titre d'exemple :

X représente les concentrations de sélamectine fixées de la gamme

Y_{obs} est le rapport $R = \text{Aire du pic}_{[\text{sélamectine}]} / \text{Aire du pic}_{[\text{Standard interne}]}$.

	X	$Y_{\text{obs}} = R$	XY	X^2	$1/X$	$1/X^2$	y/x	y/x^2
	0.5	0,053	0,0265	0,25	2.00	4.00	0,11	0,212
	1	0,091	0,091	1	1.00	1.00	0,09	0,091
	2.5	0,207	0,5175	6,25	0.40	0.16	0,08	0,033
	5	0,413	2,065	25	0.20	0.04	0,08	0,017
	10	0,844	8,44	100	0.10	0.01	0,08	0,008
	25	2,034	50,85	625	0.04	0.00	0,08	0,003
	50	4,115	205,75	2500	0.02	0.00	0,08	0,002
somme	94	7,757	267,74	3257,5	3,76	5,212	0,610	0,366
n	7							
moyenne	13.43	1.11						

Les formules décrites précédemment nous ont permis de calculer a et b :

$$\mathbf{a \approx 0,081}$$

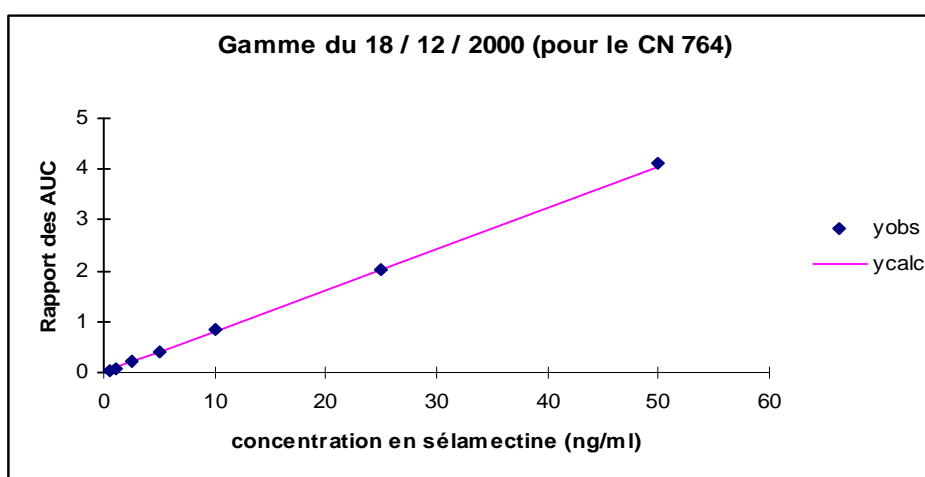
$$\mathbf{b \approx 0,012}$$

Grâce à ces deux coefficients, nous obtenons l'équation complète de la droite de régression qui nous servira à convertir la fluorescence (plus précisément les "R") des échantillons analysés en concentrations plasmatiques.

Le tableau ci-dessous récapitule les coordonnées des points observés et des points appartenant à la droite de régression.

X (ng/mL) (concentrations de la gamme)	$Y_{obs} = R_{observé}$	$y_{calc} = ax + b$ (R se trouvant sur la droite de régression)
0,5	0,05	0,05
1	0,09	0,09
2,5	0,21	0,21
5	0,41	0,42
10	0,84	0,82
25	2,03	2,03
50	4,11	4,05

Ces données nous permettent de tracer la droite de régression qui rejoint au mieux les points observés :



1.4.2. Dosage des échantillons.

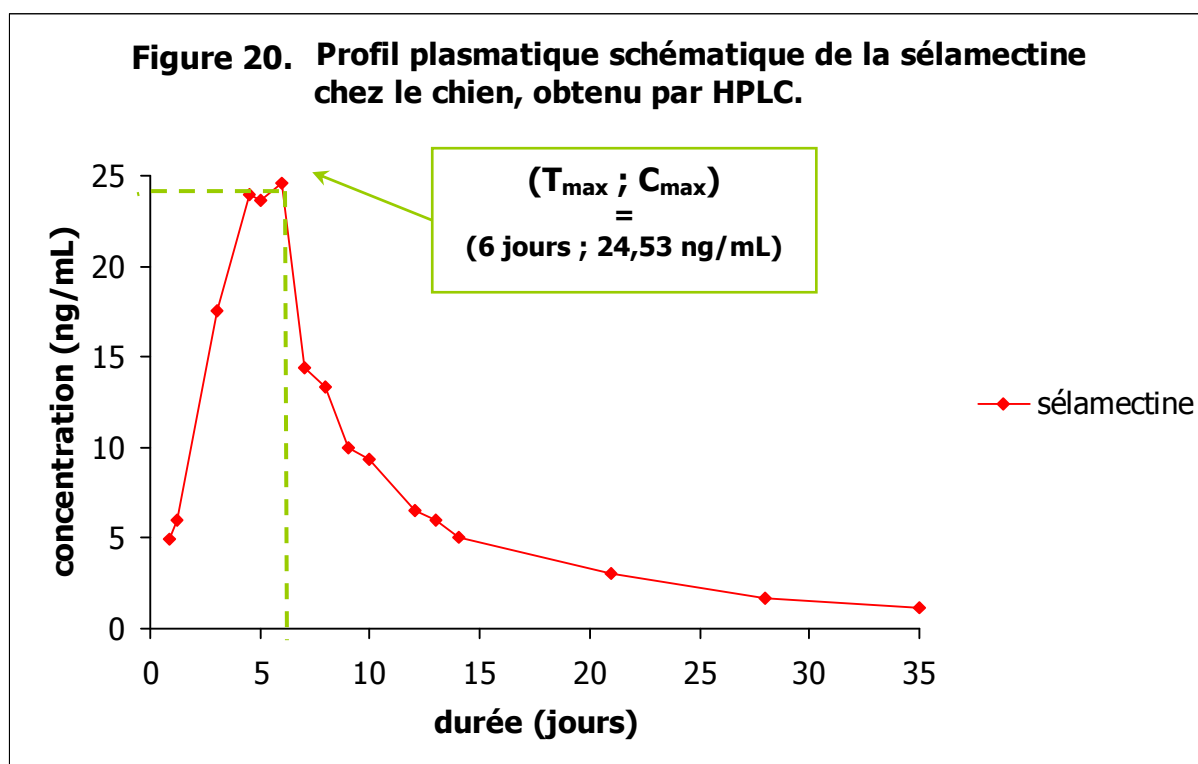
Comme la gamme d'étalonnage, les échantillons ont été adjuvés de la même quantité de standard interne : 20 μ L soit 10 ng de doramectine.

En plus des 18 points de mesure de la concentration plasmatique de sélamectine chez chaque animal (de T_0 à $T_0 + J_{35}$; Tableau 7), nous avons réalisé quatre doublets : $T_0 + 12h$; $T_0 + J_4$; $T_0 + J_8$; $T_0 + J_{20}$. Ce sont les échantillons de plasma que nous avons choisis au hasard pour être préparés et analysés "en double". Un cycle d'analyse, c'est-à-dire la réalisation d'une gamme et l'analyse des échantillons de plasma d'un animal, se faisait sur une journée. Ces doublets nous ont donc permis de calculer la précision "intra-journalière" de chaque dosage. Les gammes, étant réalisées pour chaque chien sur des journées différentes, ont servi à calculer la précision "inter-journalière" des dosages. (En guise d'illustration, ces valeurs de précision du travail d'analyse sont rapportées en annexes de ce polycopié.)

Chaque tube de plasma a ensuite subi les étapes analytiques décrites dans les paragraphes 1.2.1 à 1.2.3. : extraction purification par SPE, dérivatisation, et analyse par HPLC (Figure 16).

Le traitement de chaque série d'échantillons a permis d'établir pour chaque chien :

- (i) une gamme étalon permettant de tracer une droite de régression linéaire,
- (ii) un tableau récapitulatif des concentrations plasmatiques en sélamectine,
- (iii) une courbe représentant le profil plasmatique de la sélamectine.



Le graphique ci-dessus représente le profil pharmacocinétique de la sélamectine (concentration plasmatique en fonction du temps) chez un chien traité avec un spot-on de Stronghold® [59].

La méthode analytique employée a été celle décrite dans les paragraphes 1.2.1. à 1.2.3. Le dosage de la sélamectine s'est fait en trois temps :

- 1) l'extraction en phase solide (SPE)
- 2) la dérivation du produit purifié
- 3) l'analyse HPLC avec spectrofluorimétrie

L'équipe du Docteur Alvinerie (2001) a ainsi caractérisé pour la première fois l'évolution de la concentration plasmatique de la sélamectine chez le chien, après une application topique du principe actif :

- la phase d'absorption dure 6 jours (T_{max}) ; la concentration plasmatique maximale alors atteinte est de 24,53 ng/mL (C_{max}) : c'est le pic de concentration.

- les phases de distribution et métabolisation que l'on peut définir de façon plus ou moins empirique entre les 6^{ème} et 15^{ème} jours.

- la phase d'élimination durant laquelle le principe actif est éliminé majoritairement par voie fécale.

1.4.3. Validation de la méthode

Notre étude a été rendue possible grâce au travail préparatoire de Sutra et Alvinerie qui ont validé un protocole de dosage de la sélamectine par HPLC dans le plasma d'un chien de race Beagle (avec une SPE automatisée et une détection fluorimétrique) [59]. Ils ont montré que ce protocole de dosage a une limite de détection de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ de sélamectine par échantillon. Le matériel et les procédés décrits dans les paragraphes précédents (1.2.1 à 1.2.3) sont issus du travail de cette équipe.

Ce travail préliminaire a permis de définir une première série de valeurs des principaux paramètres pharmacocinétiques (Cf 1.3.1) et de tracer un premier profil de la concentration plasmatique de la sélamectine en fonction du temps (Figure 20).

Figure 21. Modèle de tableau utilisé pour le recueil des résultats au cours de la cinétique plasmatique de la sélamectine chez chaque animal.

- **Tableau de résultats utilisé lors de chaque cinétique plasmatique de la sélamectine :**

Echantillon	Temps (en jours)	Standard interne Aire du pic	Sélamectine Aire du pic	Rapport des aires du pic R	Concentration (en ng/mL)
A0	0				
A1	0,167				
A2	0,333				
...					
<i>A11</i>	10				
<i>A11 bis</i>	10				
...					
A35	35				

Utilisation
de la
gamme
étalon
(a et b)

- **Cas particulier des doublets :**

<i>Doublet</i>	Temps (jours)	Concentration	Concentration moyenne	Ecart type	Précision
<i>A11</i>	10	C_{11}	$\frac{C_{11} + C_{11 \text{ bis}}}{2}$	$\sigma (C_{11} ; C_{11 \text{ bis}})$	$\frac{\sigma (C_{11} ; C_{11 \text{ bis}})}{\text{Conc. Moy.}^*}$
<i>A11 bis</i>	10	$C_{11 \text{ bis}}$			

* Conc. Moy. = concentration moyenne

σ = écart-type

II. RESULTATS

2.1 Résultats de l'étude pharmacocinétique

Les animaux de chacun des deux lots (composés de 5 mâles et de 5 femelles) ont fait l'objet d'un dosage plasmatique de la sélamectine sur 35 jours après une application en spot-on du principe actif (6 mg/kg).

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, les échantillons de plasma de chacun des dix animaux ont subi les mêmes traitements sans que nous n'ayons eu connaissance, à aucun moment de l'analyse, du sexe de l'animal. Cette information nous a été communiquée une fois les dosages terminés ("dosages en aveugle").

Les résultats ont été édités pour chaque animal et consistent en :

- (i) un tableau des concentrations plasmatiques de sélamectine dont le modèle est représenté Figure 21,
- (ii) une courbe de la cinétique plasmatique de la sélamectine.

Tableau 11. Tableau récapitulatif des concentrations de sélamectine (en ng/mL) de tous les échantillons de chaque chien femelle (cinétique sur 35 jours ; 18 échantillons par animal).

		"matricules" des chiens	Femelles				
			CN 872	CN OHJ4	CN 500	CN 567	CN 693
		coefficient a	0,083129	0,0800001	0,0811961	0,0852518	0,0808427
		coefficient b	0,005851	0,00754237	-0,003918	0,0033503	0,0091119
Dates des prélèvements sanguins (deuxième colonne : en jours)	To	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	4h	0,167	1,581	1,213	1,343	0,852	2,271
	8h	0,333	1,860	1,440	1,357	0,897	2,673
	12h	0,5	2,009	2,384	2,582	1,291	3,226
	24h	1	8,205	4,253	5,030	17,855	7,255
	36h	1,5	9,973	4,704	6,757	32,348	14,118
	48h	2	19,918	5,527	10,393	37,674	13,498
	J 3	3	21,245	6,109	32,222	43,163	12,228
	J 4	4	24,046	6,840	48,853	48,043	11,045
	J 6	6	18,184	11,512	42,709	44,013	10,169
	J 8	8	14,410	12,330	20,980	30,632	9,947
	J 10	10	9,439	16,140	19,312	20,303	9,065
	J 13	13	10,194	17,404	14,836	12,154	6,901
	J 15	15	7,632	7,782	15,137	10,299	6,589
	J 20	20	4,740	5,748	10,297	7,713	5,735
	J 25	25	2,828	5,208	8,063	6,866	5,527
	J 30	30	1,990	4,500	7,414	3,701	4,734
	J 35	35	1,952	3,314	5,748	2,833	4,268

Figure 22. Courbes des cinétiques plasmatiques de la sélamectine chez les chiens femelles (de J₀ à J₃₅).

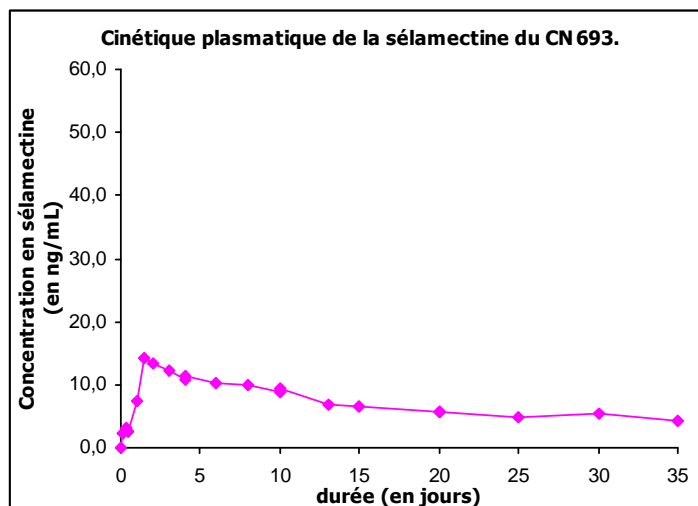
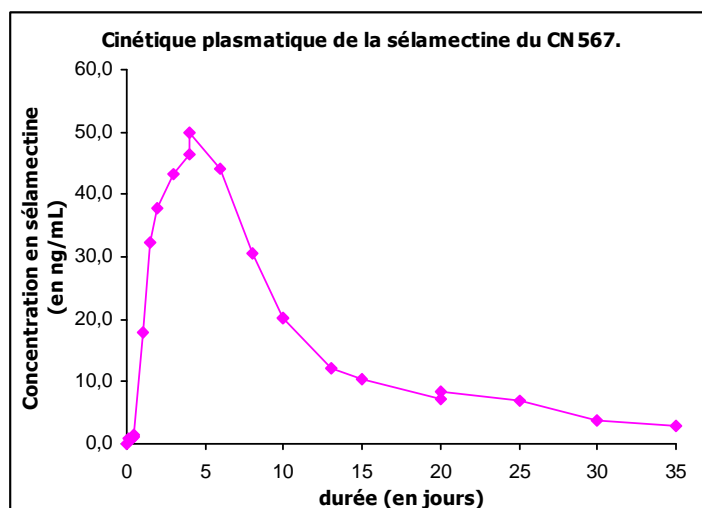
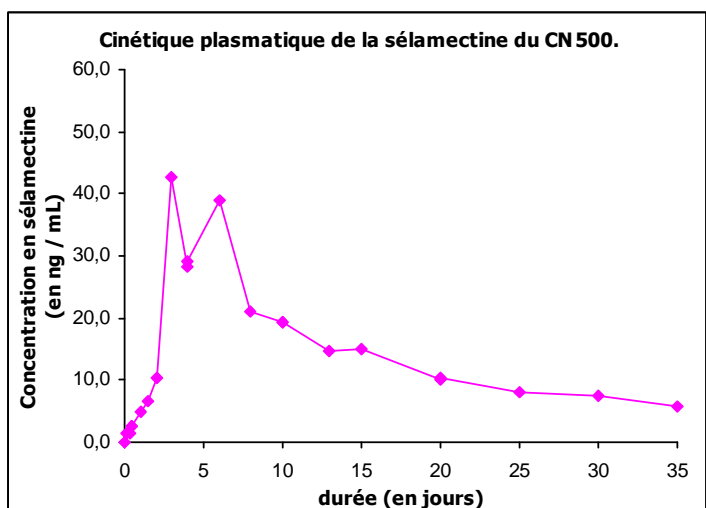
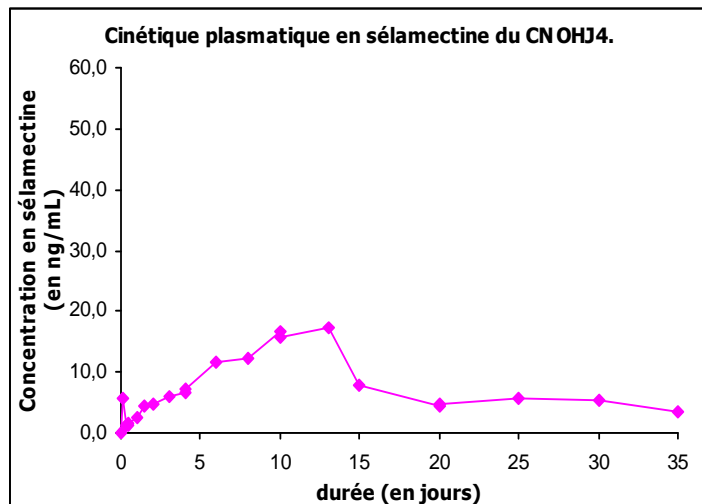
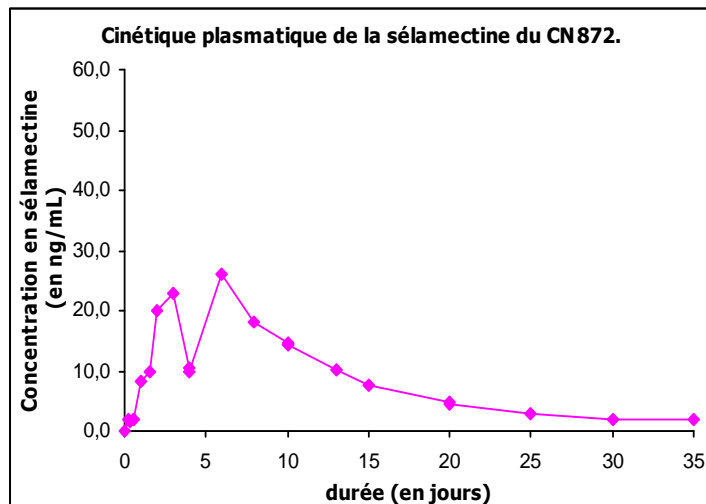


Tableau 12. Tableau récapitulatif des concentrations de sélamectine (en ng/mL) de tous les échantillons de chaque chien mâle (cinétique sur 35 jours ; 18 échantillons par animal).

		"matricules" des chiens	Mâles				
			CN 968	CN 191	CN 501	CN 506	CN 764
		coefficient a	0,087964	0,0832058	0,0830398	0,0844974	0,0808019
		coefficient b	-0,001918	0,006999	0,0149258	-0,001846	0,0119273
Dates des prélèvements sanguins (deuxième colonne : en jours)	<i>To</i>	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	<i>4h</i>	0,167	0,000	1,527	0,183	1,867	0,322
	<i>8h</i>	0,333	0,000	3,277	0,758	4,240	1,082
	<i>12h</i>	0,5	0,725	3,610	0,953	5,430	11,330
	<i>24h</i>	1	0,600	13,015	0,981	9,463	25,202
	<i>36h</i>	1,5	1,832	17,368	1,184	12,461	16,403
	<i>48h</i>	2	2,590	19,857	1,505	26,675	16,719
	<i>J 3</i>	3	6,240	14,318	1,703	23,295	10,887
	<i>J 4</i>	4	12,108	12,997	1,740	20,054	8,866
	<i>J 6</i>	6	12,217	10,690	7,390	15,060	4,979
	<i>J 8</i>	8	11,211	11,218	6,287	13,566	4,902
	<i>J 10</i>	10	6,928	8,760	6,285	8,747	4,000
	<i>J 13</i>	13	6,716	6,192	4,585	6,629	3,401
	<i>J 15</i>	15	6,907	6,200	3,818	5,937	2,087
	<i>J 20</i>	20	5,245	4,012	3,124	4,003	1,920
	<i>J 25</i>	25	5,359	2,869	2,697	3,936	1,260
	<i>J 30</i>	30	6,600	2,175	2,197	2,387	0,731
	<i>J 35</i>	35	5,329	2,125	2,128	2,096	0,692

Figure 23. Courbes des cinétiques plasmatiques de la sélamectine chez les chiens mâles (de J₀ à J₃₅).

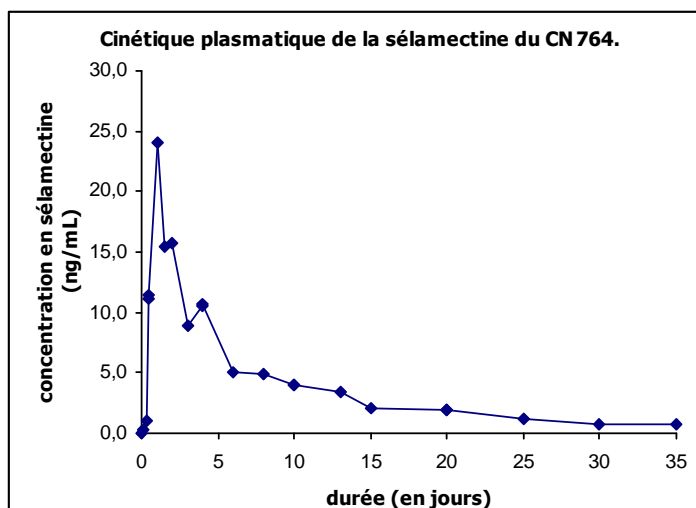
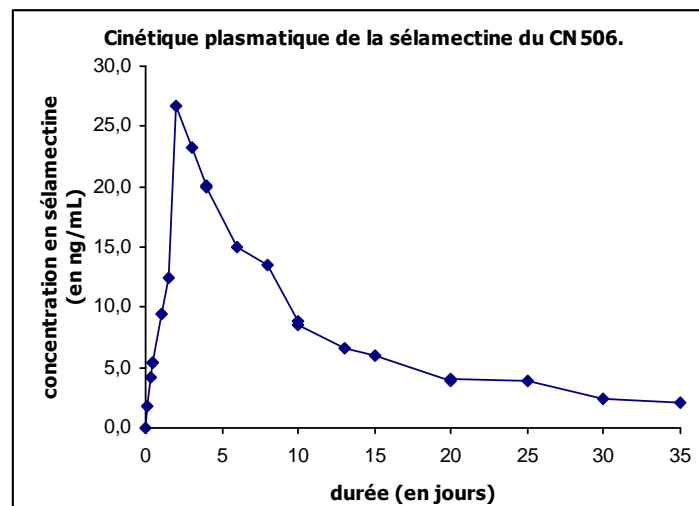
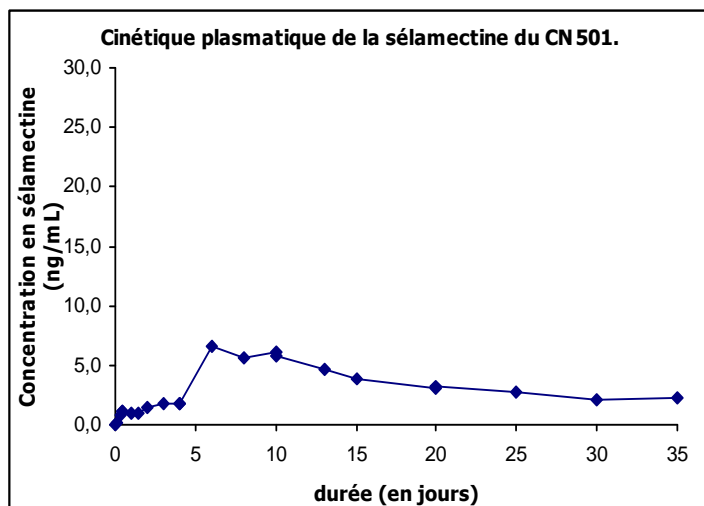
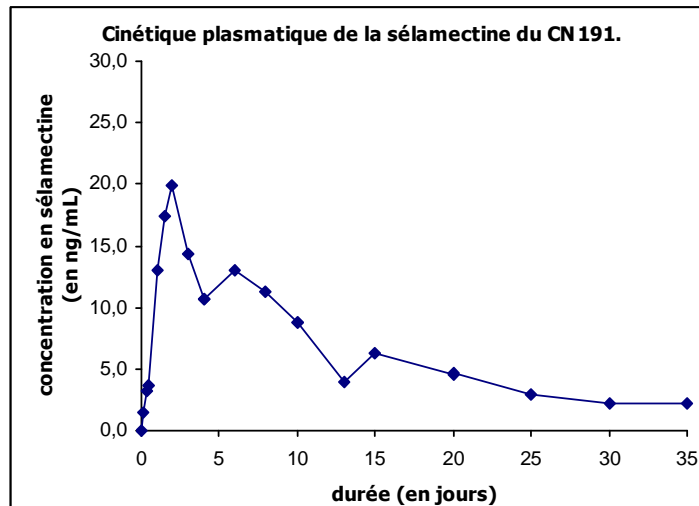
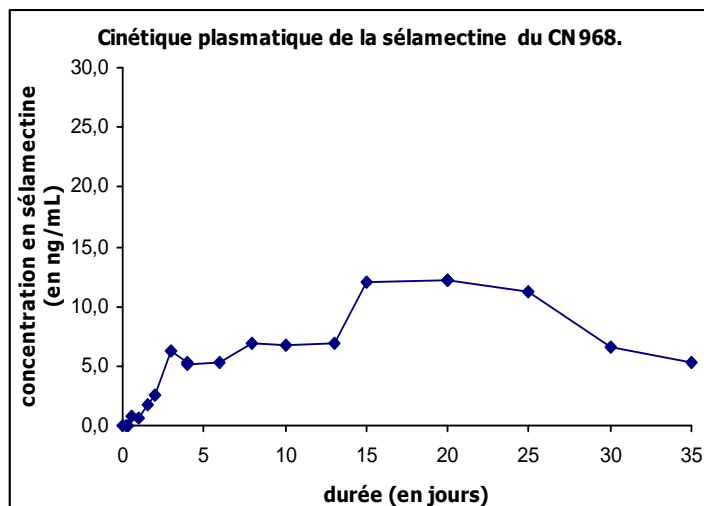
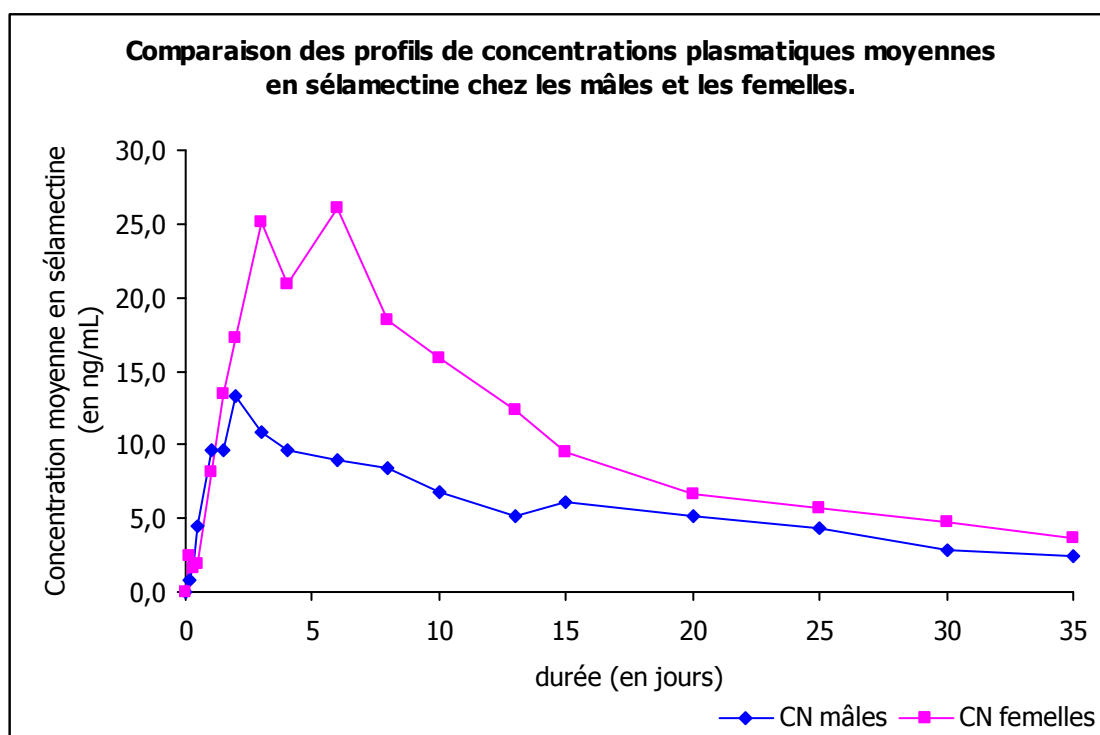


Figure 24. Courbes moyennes des cinétiques de la sélamectine chez les mâles et les femelles de l'étude.



- Nous avons établis deux tableaux des concentrations plasmatiques en sélamectine en fonction de la date de prélèvement des échantillons (Tableaux 11 et 12) et deux groupes de courbes qui présentent les résultats obtenus d'une part chez les femelles et d'autre part chez les mâles (Figures 22 et 23).

- Les moyennes des concentrations en sélamectine calculées d'une part chez les femelles et d'autre part chez les mâles (Tableaux 13 et 14) nous ont permis de tracer les courbes moyennes de la cinétique plasmatique de la sélamectine dans les deux groupes d'animaux (Figure 24).

Tableau 13. Concentrations moyennes en sélamectine chez les cinq femelles et représentation graphique des résultats.

Dates des prélèvements		concentration moyenne ± écart-type (en ng/mL)
0	To	0,000 ± 0,000
0,167	4h	2,400 ± 1,834
0,333	8h	1,655 ± 0,913
0,5	12h	1,961 ± 0,625
1	24h	8,146 ± 5,873
1,5	36h	13,490 ± 11,170
2	48h	17,237 ± 12,676
3	J 3	25,105 ± 17,360
4	J 4	20,973 ± 17,363
6	J 6	26,094 ± 15,417
8	J 8	18,415 ± 8,134
10	J 10	15,846 ± 4,472
13	J 13	12,298 ± 4,065
15	J 15	9,488 ± 3,440
20	J 20	6,597 ± 2,425
25	J 25	5,648 ± 2,007
30	J 30	4,768 ± 2,039
35	J 35	3,623 ± 1,453

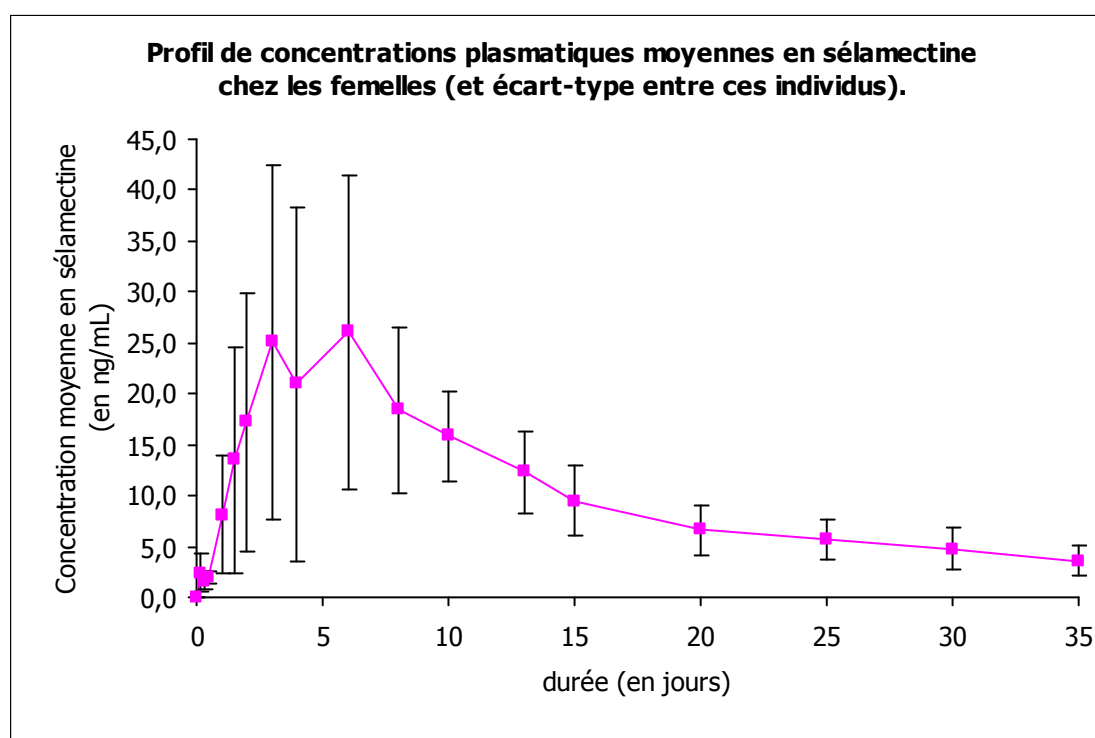


Tableau 14. Concentrations moyennes en sélamectine chez les cinq mâles et représentation graphique des résultats.

Dates des prélèvements		concentration moyenne ± écart-type (en ng/mL)
0	To	0,000 ± 0,000
0,167	4h	0,780 ± 0,854
0,333	8h	1,871 ± 1,799
0,5	12h	4,456 ± 4,288
1	24h	9,620 ± 9,690
1,5	36h	9,608 ± 7,706
2	48h	13,263 ± 10,971
3	J 3	10,884 ± 8,303
4	J 4	9,664 ± 6,931
6	J 6	9,004 ± 4,684
8	J 8	8,433 ± 3,779
10	J 10	6,834 ± 2,012
13	J 13	5,107 ± 1,576
15	J 15	6,050 ± 3,790
20	J 20	5,183 ± 4,063
25	J 25	4,395 ± 3,928
30	J 30	2,804 ± 2,221
35	J 35	2,488 ± 1,708

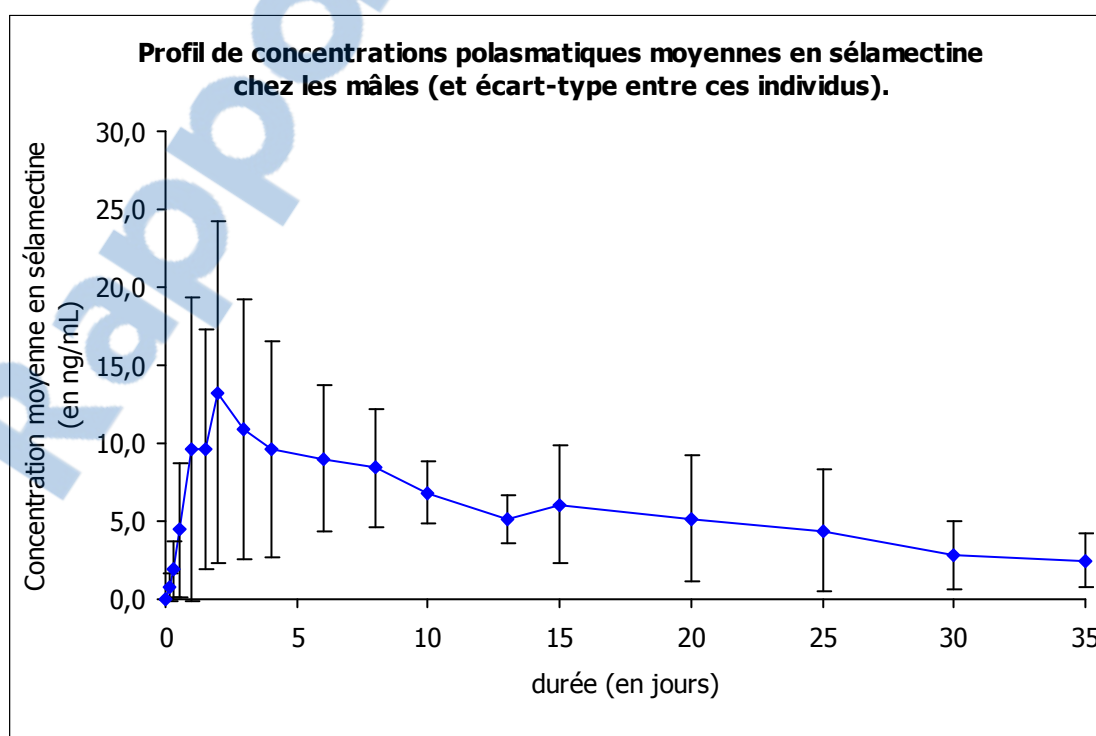


Tableau 15. Paramètres pharmacocinétiques calculés chez les dix animaux.

	Chiens mâles				
	CN 968	CN 191	CN 501	CN 506	CN 764
$t_{1/2} K_a$ (en jours)	2,10	0,54	3,65	1,00	0,19
$t_{1/2} \alpha$ (en jours)	23,41	10,02	11,69	8,71	6,85
T_{max} (en jours)	8,35	2,52	8,91	3,53	1,02
C_{max} (en ng / mL)	9,75	15,04	5,38	18,35	15,08
AUC (en ng.jour / mL)	232,29	219,31	119,91	260,51	128,39
MRT (en jours)	16,48	11,38	15,42	10,84	8,69
Cl / F (en mL / jour / kg)	25 824	27 360	50 040	23 028	46 728

	Chiens femelles				
	CN 872	CN OHJ4	CN 500	CN 567	CN 693
$t_{1/2} K_a$ (en jours)	1,61	2,96	2,69	1,11	0,68
$t_{1/2} \alpha$ (en jours)	7,78	10,92	8,89	7,34	18,73
T_{max} (en jours)	4,61	7,65	6,66	3,71	3,37
C_{max} (en ng / mL)	18,04	13,42	30,55	39,50	11,76
AUC (en ng.jour / mL)	276,24	270,58	528,47	534,21	245,36
MRT (en jours)	10,73	14,70	12,63	10,11	14,53
Cl / F (en mL / jour / kg)	21 720	22 164	11 353	11 232	24 456

Cf 1.3.1. pour les définitions de chaque paramètre et 1.3.2. pour leur mode de calcul.

K_a est la constante de vitesse d'absorption : $t_{1/2K_a}$ est le temps de demi-vie "initial".

α est la constante de vitesse d'élimination : $t_{1/2\alpha}$ est le temps de demi-vie "final".

Cl/F est la clairance observée chez chaque individu (F le facteur de biodisponibilité)

Les AUC et MRT ont été calculés par la méthode des trapèzes.

2.2 Paramètres pharmacocinétiques chez les chiens mâles et femelles

A partir des résultats "bruts" des dosages de la concentration plasmatique de la sélamectine en fonction du temps, nous avons été en mesure de calculer plusieurs paramètres caractérisant la cinétique de chaque animal : le $t_{1/2}$, le T_{max} , la C_{max} , l'AUC, le MRT et la clairance (Tableaux 15 et 16).

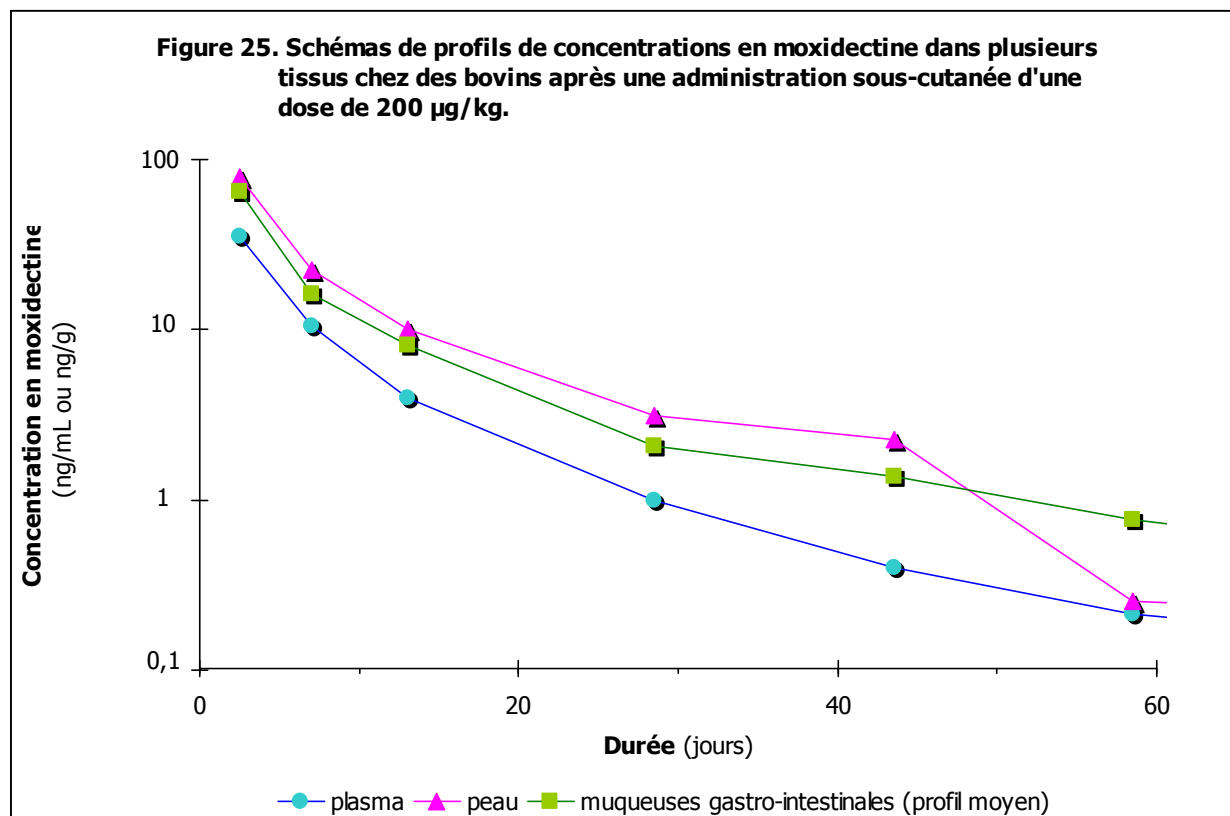
- Si T_0 est le début de la cinétique correspondant à l'application cutanée de la sélamectine, la première détection de la molécule par le système HPLC employé se situe à $T_0 + 3-4$ heures (environ 0,16 jour) et sa concentration moyenne est de $2,40 \pm 1,83$ ng/mL pour les femelles et $0,78 \pm 0,85$ ng/mL pour les mâles.
- La concentration plasmatique en sélamectine augmente ensuite jusqu'à un pic de concentration (C_{max}) égal à $22,65 \pm 11,95$ ng/mL chez les femelles et $12,72 \pm 5,13$ ng/mL chez les mâles. Ce pic est atteint en moyenne après $5,20 \pm 1,87$ jours chez les premières et à $4,86 \pm 3,56$ jours chez les seconds (c'est le T_{max}).
- Après ce C_{max} , la concentration plasmatique en sélamectine diminue progressivement jusqu'au 35^{ème} jour : à ce temps " J_{35} ", la concentration moyenne en sélamectine est $3,62 \pm 1,45$ ng/mL pour les femelles et $2,49 \pm 1,71$ ng/mL pour les mâles. Le temps de demi-vie apparent ($t_{1/2 \alpha}$) de la sélamectine sur cette phase de décroissance est de $10,73 \pm 4,68$ jours chez les femelles et $12,14 \pm 6,55$ jours chez les mâles.

Tableau 16. Comparaison des paramètres pharmacocinétiques moyens chez mâles et femelles de l'étude.

	MALES	FEMELLES
$t_{1/2} K_a$ (en jours)	1,50 ± 1,40	1,81 ± 0,99
$t_{1/2} \alpha$ (en jours)	12,14 ± 6,55	10,73 ± 4,68
T_{max} (en jours)	4,86 ± 3,56	5,20 ± 1,87
C_{max} (en ng/mL)	12,72 ± 5,13	22,65 ± 11,95
AUC (en ng.jour/mL)	192,08 ± 63,85	370,97 ± 146,87
MRT (en jours)	12,56 ± 3,27	12,54 ± 2,11
Cl/F (en mL/jour/kg)	34 596 ± 12 736	18 185 ± 6 377

- L'AUC observée chez les femelles est $370,97 \pm 146,87$ ng.jour/mL et $192,08 \pm 63,85$ ng.jour/mL chez les mâles. Le test de Student nous a permis d'affirmer que l'AUC de la sélamectine chez les femelles est significativement plus grande que chez les mâles ($p < 0,05$: Cf 1.3.2.).

- La clairance corporelle observée chez les femelles est $18\ 185 \pm 6\ 377$ mL/kg/jour et $34\ 596 \pm 12\ 736$ mL/kg/jour chez les mâles. Le test de Student nous a permis de conclure que la clairance corporelle de la sélamectine chez les mâles est significativement plus grande que chez les femelles ($p < 0,05$: Cf 1.3.2.).



L'étude menée par Lifschitz et Alvinerie (1999), avait pour but de mettre en évidence une relation entre la pharmacocinétique d'un endectocide (la moxidectine) et son activité antiparasitaire [30]. Pour cela, ils ont déterminé la biodisponibilité de la moxidectine dans le plasma et dans plusieurs tissus cibles (notamment la peau et le tube digestif) après une administration sous-cutanée de 200 µg/kg de Cydectine® 1% sur des bovins.

En pratique des analyses par HPLC ont été effectuées sur divers échantillons prélevés sur des animaux traités puis sacrifiés à des dates déterminées (entre 1 et 58 jours post-traitement) : abomasum, intestin grêle, bile, fécès, poumons, peau, plasma...

Les résultats des différents dosages dans les tissus cibles ont montré que les concentrations en moxidectine dans la peau et dans les muqueuses abomasale et intestinale étaient plus importantes que les concentrations plasmatiques.

Les tests statistiques ont également démontré une corrélation significative entre les concentrations plasmatiques et les concentrations obtenues dans ces tissus cibles (peau et muqueuses gastro-intestinales).

III. DISCUSSION

3.1 Pertinence du choix de la concentration plasmatique

En 1996, Mc Kellar et Benchaoui [33] démontrent l'importance de la pharmacocinétique dans l'étude de l'efficacité des avermectines et des milbémycines. Ils établissent que l'activité anthelminthique des endectocides est reliée à l'action spécifique du médicament sur le parasite et à la présence du pharmacophore (principe actif) sur le site d'action en concentration active et durant un temps suffisamment long pour provoquer la mort du parasite (il en est de même pour l'activité ectoparasiticide).

L'efficacité clinique des antiparasitaires est étroitement liée à leurs propriétés pharmacocinétiques qui dépendent des mécanismes d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination [5]. Plusieurs facteurs influent sur les propriétés pharmacocinétiques d'un antiparasitaire : l'espèce animale traitée, la physiologie du parasite, la formulation et la voie d'administration du principe actif.

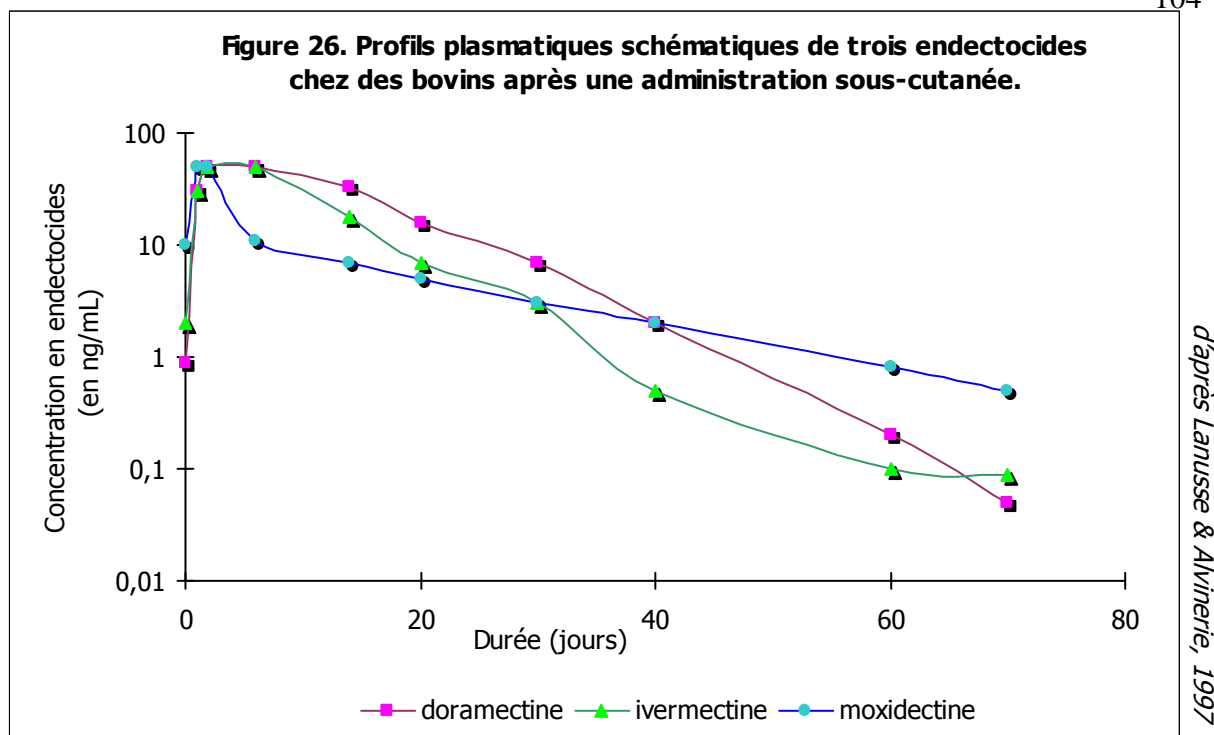
Les études pharmacocinétiques se font habituellement sur plasma.

- En 1999, Lifschitz et Alvinerie démontrent l'existence d'une corrélation entre la concentration plasmatique et la concentration dans les tissus cibles de la moxidectine (endectocide de la famille des milbémycines) [30].

La moxidectine (Cydectine[®] 1%, 200 µg/kg) a été administrée à des jeunes bovins par voie sous-cutanée, et un suivi des concentrations du principe actif dans divers tissus et fluides corporels (muqueuses et contenus de l'abomasum et de l'intestin, bile, fécès, poumons, peau et plasma) à été réalisé sur 58 jours post-traitement.

- Les courbes de suivi de la concentration en moxidectine dans les différents tissus en fonction du temps ont été tracées : la courbe du profil plasmatique était parallèle à la courbe des concentrations dans la peau (Figure 25).

- L'analyse des différents profils de la moxidectine a montré une corrélation significative entre les concentrations plasmatiques et les concentrations observées dans les muqueuses gastro-intestinales (tissu cible).



L'étude menée par Lanusse et al. en 1997 [28] avait pour but de décrire pour la première fois les biodisponibilités plasmatiques de l'ivermectine, de la moxidectine et de la doramectine grâce à une analyse standardisée (Cf 1.2.1. à 1.2.3.).

En pratique, ils ont administré par voie sous-cutanée 200 µg/kg d'Ivomec® 1% ou de Cydectine® 1% ou de Dectomax® 1% sur des bovins et ont réalisé le profil pharmacocinétique de la concentration plasmatique de chaque molécule à partir de prises de sang sur les animaux traités (entre 1 et 80 jours post-traitement).

Les résultats des dosages de l'ivermectine, de la moxidectine et de la doramectine ont donné lieu aux observations suivantes :

- la phase d'absorption de la moxidectine est la plus courte ; le temps de demi-vie de cette phase est :

1,32h pour la moxidectine vs 39,2h pour l'ivermectine et 56,4h pour la doramectine.

- le T_{max} de la moxidectine intervient le plus tôt :

8h après traitement pour la moxidectine vs 4 à 6 jours pour les deux avermectines.

- les C_{max} sont sensiblement les mêmes pour les trois molécules.

- les AUC sont plus importantes pour les avermectines :

217 ng.jour/mL pour la moxidectine vs 459 ng.jour/mL pour l'ivermectine et 627 ng.jour/mL pour la doramectine.

- le MRT est plus long pour la moxidectine :

14,6 jours vs 7,35 jours pour l'ivermectine et 9,09 jours pour la doramectine.

- Les résultats de cette étude ont également montré que le profil plasmatique de la moxidectine, notamment en ce qui concerne la rémanence de la molécule, était transposable aux tissus cibles. Cette propriété est d'autant plus remarquable que les concentrations en moxidectine, en plus d'avoir une évolution comparable dans les tissus étudiés, étaient plus importantes dans la peau (un tissu cible pour les ectoparasites) et les muqueuses abomasale et intestinale (deux tissus cibles pour les endoparasites) que dans le plasma (figure 25) : les études d'efficacité basées sur des dosages plasmatiques de cet endectocide s'en trouvaient ainsi justifiés.

- Une autre étude comparative avait été menée deux ans auparavant par Lanusse et Alvinerie (1997) sur une milbémycine (la moxidectine) et deux avermectines (la doramectine et l'ivermectine) administrés par voie sous-cutanée sur des bovins (figure 26) [28]. Les profils plasmatiques des trois molécules étaient semblables. Par extension, nous avons conclu à l'existence d'une corrélation similaire entre les concentrations plasmatiques et les concentrations cutanées de la doramectine.

- Dans notre étude, la sélamectine a été administrée par voie cutanée (spot-on). De plus, elle est obtenue à partir de la doramectine, ce qui en fait une molécule dont les propriétés physiques, et *a fortiori* les propriétés pharmacocinétiques, sont très proches de celles de la "molécule mère".

- Forts de ces observations et des résultats des deux études précédemment décrites, nous pouvions partir du principe que la sélamectine, comme la doramectine, diffuse du point où elle a été administrée vers le plasma. La concentration plasmatique reflète alors de façon pertinente sa biodisponibilité dans le tissu cible.

3.2 Intérêts et perspectives de l'étude de l'influence du sexe de l'animal sur la pharmacocinétique de la sélamectine

De nombreuses études ont déjà montré l'influence de différents facteurs sur les propriétés pharmacocinétiques de molécules médicamenteuses (formulation du principe actif, voie d'administration, état de jeûne de l'animal traité...). Dans le cas des endectocides, la formulation et le mode d'administration ont été décrits comme étant des facteurs faisant varier la biodisponibilité du principe actif de façon significative (MacKellar et Benchaoui, 1996, [33]). Très peu de publications font état de l'influence du sexe sur la biodisponibilité des médicaments. En ce qui concerne les avermectines et les milbémycines, une étude a déjà été menée sur ce sujet (Sarasola *et al.*, 2002, [52]) : la posologie alors utilisée en pour-on sur les chiens et chats de l'étude était 24 mg/kg soit une dose quatre fois supérieure à la dose thérapeutique préconisée (6 mg/kg). Pour notre part, nous avons utilisé une dose de 6 mg/kg en spot-on.

Nous avons choisi de raisonner en termes d'AUC qui traduit le niveau d'exposition de l'animal au principe actif : l'AUC ou produit de la concentration plasmatique en fonction du temps est désormais reconnu pour être bien plus représentatif de l'effet anti-parasitaire que la dose administrée (Rowland et Tozer, 1995, [50]). Ceci s'explique par le fait que la dose est une variable imposée ; elle est transformée par l'organisme en un profil de concentrations variant dans le temps en fonction des propriétés physiologiques et métaboliques de l'organisme : dans ces conditions, il paraît raisonnable de considérer que le profil de concentrations plasmatiques est plus pertinent que la dose (Cf **3.1.**).

Nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une différence significative des AUC entre chiens mâles et femelles : les valeurs des AUC sont plus faibles chez les mâles (192,08 ng.jour/mL) que chez les femelles (370,97 ng.jour/mL). Le pic de concentration (C_{max}) est également, en moyenne, plus bas chez les mâles (12,72 ng/mL) que chez les femelles (22,6 ng/mL) mais en raison de la grande variabilité des valeurs, nous n'avons pu conclure à une différence significative pour ce paramètre.

Dans notre étude, un autre paramètre varie de façon significative selon le sexe de l'animal ; il s'agit de la clairance dont la valeur est plus importante chez les mâles (34 596 mL/kg/jour) que chez les femelles (18 185 mL/kg/jour).

Nous pouvons trouver plusieurs explications à ces résultats :

- La première hypothèse reposerait sur la différence de métabolisme entre un mâle et une femelle. Les facteurs susceptibles d'augmenter le métabolisme basal sont le poids, la taille, l'état physiologique (gestation, allaitement), la masse musculaire (qui engendre une dépense énergétique d'entretien 6 à 10 fois plus importante que la masse grasse), le sexe et l'âge. Selon les auteurs, ces deux derniers paramètres semblent cependant être sujets à controverses chez le chien contrairement à ce que l'on observe chez l'Homme (pour lequel les besoins énergétiques sont supérieurs chez les individus masculins et jeunes par rapport aux individus respectivement féminins et âgés).

En supposant que le chien mâle a une activité métabolique basale plus importante que celle de la femelle, notre première hypothèse expliquerait la différence de clairance plasmatique de la selamectine entre mâles et femelles : avec un métabolisme plus intense, le médicament est éliminé plus rapidement ; ce qui correspond à des valeurs de clairance plus élevées et par conséquent à des valeurs d'AUC plus basses (biodisponibilité plus faible) chez les individus mâles.

- Une autre hypothèse s'appuierait sur une caractéristique physiologique des femelles : ces individus présentent une masse graisseuse plus importante que chez leurs homologues mâles. Ce tissu adipeux constitue un réservoir à partir duquel la sélamectine peut être relarguée de manière progressive dans le temps d'où une biodisponibilité augmentée (valeurs d'AUC plus élevées) et des valeurs de clairance plus faibles.

3.3. Conclusion

Au final, les résultats de notre étude pourraient être exploités à des fins thérapeutiques. L'objectif ultime d'un traitement réside dans l'élaboration d'un schéma thérapeutique (dose, fréquence, durée) totalement personnalisé, autrement dit dans la mise en place d'un traitement au "cas par cas". En combinant les études d'efficacité de la sélamectine avec nos présents travaux, il serait envisageable de développer des doses de sélamectine spécifiques à chaque chien selon que ce soit un mâle ou une femelle.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle DERLON Anne-Laure, Madeleine, Josiane

a été admis(e) sur concours en : 1999

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 15/09/05

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, M. FRANC, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle DERLON Anne-Laure, Madeleine, Josiane

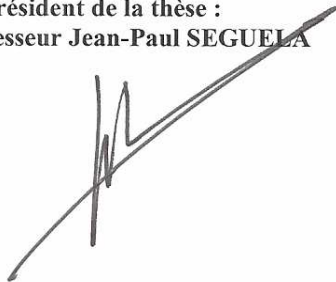
intitulée :

« Etude pharmacocinétique de l'influence du sexe sur le profil plasmatique de la sélamectine chez le chien. »»

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Michel FRANC**




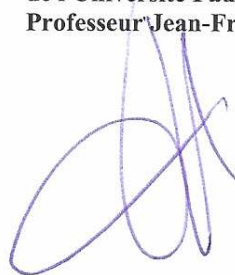
**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jean-Paul SEGUELA**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu le : 29 SEP. 2006
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU**



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Anderson DL, Roberson EL. **Activity of ivermectin against canine intestinal helminths.** Am J Vet Res. 1982 Sep ; 43(9) : 1681-1683.

- 2- Arena JP, Liu KK, Paress PS, Frazier EG, Cully DF, Mrozik H, Schaeffer JM. **The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans* : correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity.** J Parasitol. 1995 Apr ; 81(2) : 286-294.

- 3- Arena JP, Liu KK, Paress PS, Cully DF. **Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus* oocytes.** Mol Pharmacol. 1991 Sep ; 40(3) : 368-374.

- 4- Armour J, Bairden K, Preston JM. **Anthelmintic efficiency of ivermectin against naturally acquired bovine gastrointestinal nematodes.** Vet Rec. 1980 Sep 6 ; 107(10) : 226-227.

- 5- Baggot JD & Mc Kellar QA. **The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs : the role of pharmacokinetics.** J. Vet. Pharmacol. Therap. 1994 ; 17 : 409-419.

- 6- Bishoop BF, Bruce CI, Evans NA, Goudie AC, Gration KA, Gibson SP, Pacey MS, Perr Walshe ND, Witty MJ. **Selamectin : a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats.** Vet Parasitol. 2000 Aug 23 ; 91 : 163-176.

7- Brown H., Matzuk A., Ilves I., Peterson L., Harris S., Sarett L., Egerton J., Yakstis J., Campbell W. & Cuckler A., 1961. **Antiparasitic drugs IV. 2-(4'-Thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic.** J.Am.Chem.Soc., 83 : 1764-1765.

8- Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S. **Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation.** Antimicrob Agents Chemother. 1979 Mar ; 15(3) : 361-367.

9- Campbell WC. **Benzimidazoles: veterinary uses.** Parasitol Today. 1990 Apr ; 6(4) : 130-133.

10- Chabala JC, Mrozik H, Tolman RL, Eskola P, Lusi A, Peterson LH, Woods MF, Fisher MH, Campbell WC, Egerton JR, Ostlind DA. **Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent.** J Med Chem. 1980 Oct ; 23(10) : 1134-1136.

11- Craig TM. **Anthelmintic resistance.** Vet Parasitol. 1993 Feb ; 46(1-4) : 121-131.

12- Edwards G. **Ivermectin : does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity ?** Filaria J. 2003 Oct 24 ; 2 Suppl 1 : S8.

13- Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS, Eary CH, Suhayda D, Cifelli S, Riek RF, Campbell WC. **Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the B1a component.** Antimicrob Agents Chemother. 1979 Mar ; 15(3) : 372-378.

14- Gibson TE. **Observations on the value of small daily doses of phenothiazine for the control of trichostrongylosis in sheep.** J Comp Pathol. 1950 Apr ; 60(2) : 117-132.

15- Gordon HM. **Thiabendazole: a highly effective anthelmintic for sheep.** Nature. 1961 Sep 30;191 : 1409-1410.

16- Goudie AC, Evans NA, Gratton KAF, Bishop BF, Gibson SP, Holdom KS, Kaye B, Wicks SR, Lewis D, Weatherley AJ, Bruce CI, Herbert A, Seymour DJ. **Doramectin – a potent novel endectocide.** Vet Parasitol. 1993 ; 49 : 5-15.

17- Guedon J. **Oesophagostomose larvaire des bovidés – Essai d'un nouvel anthelminthique : la phénothiazine.** Foulon, 1942, 75 pages.

18- Hennessy DR. **WAAVP (World association for the advancement of veterinary parasitology)/ Pfizer award for excellence in veterinary parasitology research. My involvement in, and some thoughts for livestock parasitological research in Australia.** Vet Parasitol. 2000 Feb 29 ; 88(1-2) : 107-116.

19- Hoff DR, Fisher MH, Bochis RJ, Lusi A, Waksmunski F, Egerton JR, Yakstis JJ, Cuckler AC, Campbell WC. **A new broad-spectrum anthelmintic: 2-(4-thiazolyl)-5-isopropoxycarbonylamino-benzimidazole.** Experientia. 1970 May 15 ; 26(5) : 550-551.

20- Hopper K, Aldrich J, Haskins SC. **Ivermectin toxicity in 17 collies.** J Vet Intern Med. 2002 Jan-Feb ; 16 (1) : 89-94.

21- Horton RJ. **Benzimidazoles in a wormy world.** Parasitol Today. 1990 Apr ; 6(4) : 106.

22- Hotson IK. **The avermectins: A new family of antiparasitic agents.** J S Afr Vet Assoc. 1982 Jun ; 53(2) : 87-90.

23- Jacobs DE. **Selamectin – a novel endectocide for dogs and cats.** Vet Parasitol. 2000 Aug 23 ; 91 : 161-162.

24- Jerram PJ. **Adverse reaction to ivermectin in a rough-coated Collie.** N Z Vet J. 1985 Dec ; 33 (12) : 216.

25- Krautmann MJ, Novotny MJ, De Keulenaer K, Godin CS, Evans EI, Mc Call JW, Wang C, Rowan TG, Jernigan AD. **Safety of Selamectin in cats.** Vet Parasitol. 2000 ; 91 : 393-403.

26- Lankas GR, Cartwright ME, Umbenhauer D. **P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity.** Toxicol Appl Pharmacol. 1997 Apr ; 143(2) : 357-365.

27- Lanusse CE, Prichard RK. **Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants.** Drug Metab Rev. 1993 ; 25(3) : 235-279.

28- Lanusse C, Lifschitz A, Virkel G, Alvarez L, Sanchez S, Sutra JF, Galtier P, Alvinerie M. **Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle.** J. Vet. Pharmacol. Therap. 1997 ; 20 : 91-99.

29- Lazarus M, Rogers WP. **The mode of action of phenothiazine as an anthelmintic; the uptake of ³⁵S-labelled phenothiazine by the tissues of nematode parasites and their hosts.** Aust J Sci Res (B). 1951 May ; 4(2) : 163-179.

30- Lifschitz A, Virkel G, Imperiale F, Sutra JF, Galtier P, Lanusse C, Alvinerie M. **Moxidectin in cattle : correlation between plasma and target tissues disposition.** J Vet Pharmacol Ther. 1999 Aug ; 22 (4) : 266-273.

31- Lumaret JP, Errouissi F. **Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures.** Vet Res. 2002 Sep-Oct ; 33(5) : 547-562.

32- Mc Kellar QA & Scott EW. **The benzimidazole anthelmintic agents – a review.** J. Vet. Pharmacol. Therap. 1990 ; 13 : 223-247.

33- Mc Kellar QA & Benchaoui HA. **Avermectins and milbemycins.** J. Vet. Pharmacol. Therap. 1996 ; 19 : 331-351.

34- Mc Tier TL, Shanks DJ, Jernigan AD, Rowan TG, Jones RL, Murphy MG, Wang C, Smith DG, Holbert MS, Blagburn BL. **Evaluation of the effects of selamectin against adult and immature stages of fleas (*Ctenocephalides felis felis*) on dogs and cats.** Vet Parasitol. 2000 ; 91 : 201-212.

35- Mc Tier TL, Shanks DJ, Watson P, Mc Call JW, Genchi C, Six RH, Thomas CA, Dickin SK, Pengo G, Rowan TG, Jernigan AD. **Prevention of experimentally induced heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in dogs and cats with a single topical application of selamectin.** Vet Parasitol. 2000 ; 91 : 259-268.

36- Mc Tier TL, Siedek EM, Clemence RG, Wren JA, Bowman DD, Hellmann K, Holbert MS, Murphy MG, Young DR, Cruthers LR, Smith DG, Shanks DJ, Rowan TG, Jernigan AD. **Efficacy of selamectin against experimentally induced and naturally acquired ascarid (*Toxocara canis* and *Toxascaris leonina*) infections in dogs.** Vet Parasitol. 2000 ; 91 : 333-345.

37- Madsen M, Gronvold J, Nansen P, Holter P. **Effects of treatment of cattle with some anthelmintics on the subsequent degradation of their dung.** Acta Vet Scand. 1988 ; 29(3-4) : 515-517.

38- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. **Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene.** Pharmacogenetics 2001 Nov ; 11 (8) : 727-733.

39- Miller TW, Chaiet L, Cole DJ, Cole LJ, Flor JE, Goegelman RT, Gullo VP, Joshua H, Kempf AJ, Krellwitz WR, Monaghan RL, Ormond RE, Wilson KE, Albers-Schonberg G, Putter I. **Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties.** Antimicrob Agents Chemother. 1979 Mar ; 15(3) : 368-371.

40- Mrozik H, Linn BO, Eskola P, Lusi A, Matzuk A, Preiser FA, Ostlind DA, Schaeffer JM, Fisher MH. **Syntheses and biological activities of 13-substituted avermectin aglycons.** J Med Chem. 1989 Feb ; 32(2) : 375-381.

41- Mugford CA, Kedderis GL. **Sex-dependent metabolism of xenobiotics.** Drug Metab Rev. 1998 Aug ; 30(3) : 441-498.

42- Novotny MJ, Krautmann MJ, EhrhartJC, Godin CS, Evans EI, McCall JW, Sun F, Ro Jernigan AD. **Safety of Selamectin in dogs.** Vet Parasitol. 2000 ; 91 : 377-391.

43- Okazaki T, Ono M, Aoki A, Fukuda R. **Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: producing organism and its mutants.** J Antibiot (Tokyo). 1983 Apr ; 36(4) : 438-441.

44- Ostlind DA, Cifelli S, Lang R. **Insecticidal activity of the anti-parasitic avermectins.** Vet Rec. 1979 Aug 25 ; 105(8) : 168.

45- Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS Jr, DiPietro JA. **Clinical observation in collies given ivermectin orally.** Am J Vet Res. 1987 Apr ; 48 (4): 684-685.

46- Paul AJ, Tranquilli WJ, Hutchens DE. **Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies.** Am J Vet Res. 2000 May ; 61(5) : 482-483.

47- Pillai U, Harran L, Blackwell D, Updike L. **Toxicokinetics of selamectin in rats and dogs.** In : Soback S, Mc Kellar Q (eds), *Proceeding of the 8th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT) 2000.* Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 23, supplement 1.

48- Pulliam JD, Seward RL, Henry SA, Steinberg SA. **Investigating ivermectin hypersensibility in Collies.** Vet. Med., 1985 ; 80 : 33-40.

49- Rew RS. **Mode of action of common anthelmintics.** J. Vet. Pharmacol. Therap. 1978 ; 1 : 183-198.

50- Rowland M, Tozer T. **Clinical Pharmacokinetics : Concepts and Applications.** Book, May 1995.

51- Ryan WG. **Ivermectin / Doramectin / Moxidectin - Structure and Generation.** Revue Mériale 1999, d'après Shoop, WL, Mrozik, H, Fisher, M. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. Veterinary Parasitology 1995, 59 : 139-156.

52- Sarasola P, Jernigan AD, Walker DK, Castledine J, Smith DG, Rowan TG. **Pharmacokinetics of selamectin following intravenous, oral and topical administration in cats and dogs.** J Vet Pharmacol Ther. 2002 Aug ; 25(4) : 265-272.

53- Schaeffer JM, Haines HW. **Avermectin binding in *Caenorhabditis elegans*. A two-state model for the avermectin binding site.** Biochem Pharmacol. 1989 Jul 15 ; 38(14) : 2329-2338.

54- Schinkel AH. **P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier.** Adv. Drug Delivery Rev., 1999 ; 36 :179-194.

55- Shanks DJ, McTier TL, Behan S, Pengo G, Genchi C, Bowman DD, Holbert MS, Smith DG, Jernigan AD, Rowan TG. **The efficacy of selamectin in the treatment of naturally acquired infestations of *Sarcoptes scabiei* on dogs.** Vet Parasitol. 2000 Aug 23 ; 91(3-4) : 269-281.

56- Shoop WL, Mrozik H, Fisher MH. **Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health.** Vet Parasitol. 1995 ; 59 : 139-156.

57- Six RH, Sture GH, Thomas CA, Clemence RG, Benchaoui HA, Boy MG, Watson, Smith DG, Jernigan AD, Rowan TG. **Efficacy and safety of selamectin against gastrointestinal nematodes in cats presented as veterinary patients.** Vet Parasitol. 2000 ; 91 : 321-331.

58- Stone OJ, Mullins JF, Willis CJ. **Inhibition of nematode development with thiabendazole.** J Invest Dermatol. 1964 Nov;43:437.

59- Sutra JF, Cadiergues MC, Dupuy J, Franc M, Alvinerie M. **Determination of selamectin in dog plasma by high performance liquid chromatography with automated solid phase extraction and fluorescence detection.** Vet Res. 2001 Sep-Oct ; 32(5) : 455-461.

60- Tolan JW, Eskola P, Fink DW, Mrozik H, Zimmerman LA. **Determination of avermectins in plasma at nanogram levels using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** J Chromatogr. 1980 Apr 4 ; 190(2) : 367-376.

61- Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL. **Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis.** Am J Vet Res. 1989 May;50(5):769-770.

62- Tranquilli WJ, Paul AJ, Todd KS. **Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies.** Am J Vet Res. 1991 Jul ; 52(7) : 1170-1172.

63- Wescott RB, Farrell CJ, Gallina AM, Foreyt WJ. **Efficacy of avermectin B1a for treatment of experimentally induced nematode infections in cattle.** Am J Vet Res. 1980 Aug;41(8):1326-1328.

64- www.pfizer-vet.fr/data/produits/infos/doc_19_68_2.pdf : **Monographie technique Stronghold® (sélamectine) : Endectocide pour chiens et chats en spot-on.** Document réalisé par Pfizer Santé Animale, 2000.

65- www.pfizer-vet.fr/data/produits/produits_doc/doc_19_68_1.pdf : **Notice du Stronghold®, solution pour spot-on.** Document réalisé par Pfizer Santé Animale, Fév. 2001.

66- www.rocler.qc.ca/pdubeui/chromatographie/chroma3.html : **ensemble de schémas explicatifs de la chromatographie en phase liquide.**

67- Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. **A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer.** J Pharmacobiodyn. 1981 Nov ; 4(11) : 879-885.

ANNEXES

Pharmacokinetics of Selamectin in Dogs after Topical Application

J. Dupuy¹, A.L. Derlon², J.F. Sutra¹, M.C. Cadiergues², M. Franc² and M. Alvinerie^{1*}

¹Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, INRA, 180 Chemin de Tournefeuille, BP3, 31931 Toulouse Cedex 9, France; ²Unité Associée INRA de Physiopathologie et Toxicologie expérimentales, Ecole Nationale Vétérinaire, 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

*Correspondence: Email: malviner@toulouse.inra.fr

Dupuy, J., Derlon, A.L., Sutra, J.F., Cadiergues, M.C., Franc, M. and Alvinerie, M., 2004. Pharmacokinetics of selamectin in dogs after topical application. *Veterinary Research Communications*, **28**(5), 407–413

ABSTRACT

Some pharmacokinetic parameters of selamectin were determined in male ($n = 5$) and female ($n = 5$) Beagle dogs following a topical application at a dose rate of 6 mg/kg. The plasma concentration versus time data for the drug were analysed using a one-compartment model. The maximum plasma concentrations of 12.72 ± 5.13 ng/ml for males and 22.65 ± 11.95 ng/ml for females occurred around 5 days after administration. The area under the concentration–time curve (AUC) was 192.08 ± 63.85 ng.day/ml for males and 370.97 ± 146.87 ng.day/ml for females. The mean residence time was the same in males and females (12.55 days). This study reveals a sex-influence on the disposition of selamectin in the plasma of dogs, which implies that further information will be needed for correlation with efficacy studies in dogs.

Keywords: dog, selamectin, sex influence, topical application

Abbreviations: Abbreviations of pharmacokinetic parameters are given in Table I and in the text

INTRODUCTION

Avermectins and milbemycins are important antiparasitic agents owing to their wide spectrum of activity, high potency, relative safety margin and unique mechanism of action. A number of avermectins are currently licensed for use in livestock and horses against a wide range of endoparasites and ectoparasites and have been available for several years (Shoop *et al.*, 1995). The avermectins/milbemycins (ivermectin, milbemycin oxime and moxidectin) are currently licensed for use in companion animals against only internal parasites, although some of these have activity, at label or higher doses, against mites.

The therapeutic potential of the avermectin/milbemycin family of endectocides has not been fully realized for companion animals, either because of idiosyncratic toxicity in certain breeds such as Collie dogs or because of a lack of activity against key parasites.

Selamectin is a novel avermectin, structurally related to doramectin, that has a unique combination of safety in all most breeds and potency against both external and internal parasites of dogs and cats (Novotny *et al.*, 2000). Selamectin administered topically as a simple 'spot on' application has efficacy against sarcoptic mange, ear mites, ticks and certain intestinal helminths; it prevents heartworm diseases, and is highly potent against fleas (McTier *et al.*, 2000).

Several studies have described the efficacy of selamectin on parasites. However, only a few studies are available on the pharmacokinetics on this drug in companion animals. The disposition of avermectins in treated animals is influenced by various parameters factors (MacKellar and Benchaoui, 1996). Sex-dependent differences in the metabolism of xenobiotics are important because of the resulting modifications in pharmacokinetics, including lower clearance in the sex with the lower rate of metabolism (Mugford and Kedderis, 1998). A more rapid absorption of ivermectin and doramectin and a 10% smaller area under the concentration–time curve of both drugs has been reported in steers compared with heifers following subcutaneous administration (Toutain *et al.*, 1997). For selamectin, discrepancies between results concerning males and females rats and dogs have been reported (Pillai *et al.*, 2000). Indeed, following daily oral dosing of selamectin in rats, the observed peak plasma concentration (C_{max}) and area under the concentration–time curve (AUC) were higher in female than in male rats. In contrast, C_{max} and AUC were generally higher in treated male dogs than in females.

We report here the pharmacokinetics of selamectin in adult Beagle dogs after a spot-on application at the recommended dose of 6 mg/kg body weight. In addition, the influence of sex on selamectin disposition was studied by comparison of the main pharmacokinetic parameters in males and female dogs.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Ten adult Beagle dogs were allocated into two groups based on their sex: 5 males (7–8 years and weighing 12.9–13.8 kg) and 5 females (7–11 years and weighing 12–18.2 kg). Each animal was housed in a stainless-steel cage. They were fed with a dry ration and water was available *ad libitum*. They were acclimatized for 14 days before the treatment.

Treatment

A commercial solution of selamectin (Stronghold 240 mg, Pfizer, Orsay, France) was applied topically at a dose of 6 mg/kg body weight. Selamectin was dispensed as a spot-on application at the skin of the neck, using a 1 ml syringe.

Blood sampling

Blood samples (5 ml each) were collected from the antebrachial vein into EDTA vacutainer tubes at 0 (pre-treatment), 0.16, 0.33, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 20, 25, 30 and 35 days after drug administration. The plasma was separated by centrifugation at 500g for 15 min and stored at -18°C until analysis.

Analytical method

The plasma samples were analysed for selamectin concentration using a newly described method (Sutra *et al.*, 2001). Briefly, 0.75 ml of acetonitrile and 0.25 ml of water were added to 1 ml of plasma. After mixing for 20 min, the tube was centrifuged at 2000g for 2 min. The supernatant was then applied to a Supelco C18 cartridge (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) and, after washing with 2 ml of water followed by 1 ml of water-methanol (75:25 v/v), the selamectin was eluted with 2 ml of acetonitrile. The formation of the fluorophore of selamectin was achieved by using a previously described process for moxidectin (Alvinerie *et al.*, 1995). The dry extract was dissolved in 100 μl of 1-*N*-methylimidazole solution in acetonitrile (1:1; v/v); to initiate the derivatization, 150 μl of trifluoroacetic anhydride solution in acetonitrile (1:2; v/v) were added. After mixing (< 30 s), an aliquot (100 μl) was injected directly into the chromatographic system.

The HPLC system consisted of a model 420 pump (Kontron, Paris, France), a model 360 automatic injector (Kontron, Paris, France) and a model FP-920 fluorescence detector (Jasco, Tokyo, Japan) connected to a data station Kroma System 2000 (Kontron, Paris, France). The separation was carried out on a stainless-steel analytical column (250 \times 4.6 mm i.d.) packed with Supelcosil LC18 (5 μm) material (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The mobile phase of acetic acid (0.4%)–Pic B₇–methanol–acetonitrile (4 + 0.4 + 40 + 55.6; by vol) was pumped at a flow rate of 1.4 ml/min. The detector was fixed at an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 465 nm. The quantification limit of the method was 0.1 ng/ml, with a coefficient of variation of 2.88%.

Data analysis

The following bi-exponential equation was fitted to the plasma concentration–time data using a program adapted from MULTI (Yamaoka *et al.*, 1981):

$$C(t) = A_1 e^{-\alpha t} - A_2 e^{-k(a)t}$$

In this equation A_1 and A_2 are the intercepts, $C(t)$ is the plasma concentration at time t , $k(a)$ is the estimated first-order rate constant of selamectin absorption, and α is the first-order rate constant of selamectin elimination. The area under the curve (AUC) and the mean residence time (MRT) were calculated from $t = 0$ to the last measurable

concentration (t -last) using the arithmetic trapezoidal rule without extrapolation to infinity. All sets of data were analysed using a monocompartmental approach. In this experiment, the body clearance (Cl_B/F) represents the dose/AUC.

Means and standard deviations (SD) were calculated for all investigated parameters. Data were subjected to statistical analyses using Student's t -test performed with the InStat 2.01 software (Graph PAD, San Diego, CA, USA). In all cases, a value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

The arithmetic plot of the mean plasma concentrations of selamectin after the spot-on application of 6 mg/kg to 10 dogs (5 males and 5 females) is shown in Figure 1. The corresponding pharmacokinetic parameters are reported in Table I. Selamectin was first detected at 3–4 h (0.16 day) after treatment (2.40 ± 1.83 ng/ml for females and 0.78 ± 0.85 ng/ml for males). The plasma concentrations increased progressively to reach a maximal peak concentration (C_{max}) of 12.72 ± 5.13 ng/ml for males and 22.65 ± 11.95 ng/ml for female dogs. The calculated time of peak occurrence was 4.86 ± 3.56 days for males and 5.20 ± 1.87 days for females. Thereafter, the plasma concentrations decreased progressively with apparent terminal half-life of 12.14 ± 6.55 days for males and 10.73 ± 4.68 days for females. At the last sampling time (35 days), the plasma concentrations were 2.49 ± 1.71 ng/ml for males and 3.62 ± 1.45 ng/ml for females. The AUC in female dogs (370.97 ± 146.87 ng.day/ml) was significantly higher than that in males (192.08 ± 63.85 ng.day/ml). The clearance value (Cl_B/F) was significantly higher in males ($34\,596 \pm 12\,736$ ml/kg.day) than in females ($18\,185 \pm 6377$ ml/kg.day).

DISCUSSION

The disposition of avermectins, including persistence in the body, volume of distribution and linear pattern of their pharmacokinetics, varies in treated animals and is influenced by various factors such as type of formulation and/or route of administration (MacKellar and Benchaoui, 1996). Among other factors, sex has been reported to have a significant influence on various two pharmacokinetic parameters (Toutain *et al.*, 1997).

No publications are available on the pharmacokinetics of selamectin at the recommended dose (6 mg/kg body weight) in dogs. One pharmacokinetic study has been performed with selamectin following oral and topical administration in cats and dogs (Sarasola *et al.*, 2002) but at a higher dose (24 mg/kg). It is generally accepted that the actual dose of an extravascularly administered drug is better represented by the systemic AUC than by the dosage administered (Rowland and Tozer, 1995). We observed a significant difference in the AUC between male and female Beagles. The values of AUC for males were significantly lower than those obtained for females. The extent of absorption reflected on the observed peak plasma concentration (C_{max}) of

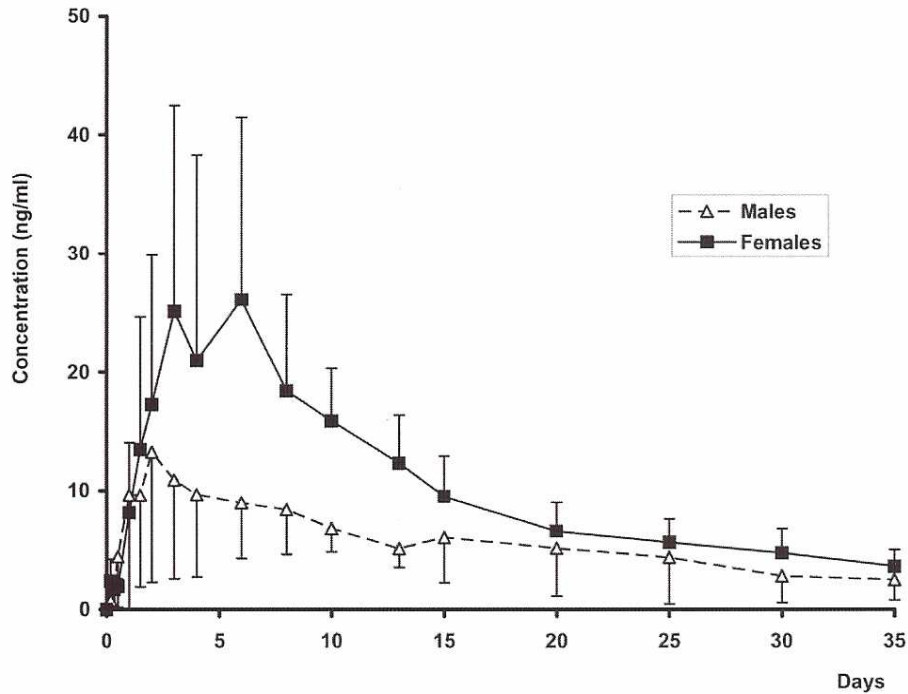


Figure 1. Plasma concentration–time curve (mean \pm SD) for male ($n = 5$) and female ($n = 5$) Beagle dogs treated with 6 mg/kg of selamectin (spot-on administration).

TABLE I

Mean \pm SD for selected pharmacokinetic parameters of selamectin in male and female dogs ($n = 10$) following a spot-on application at a dosage of 6 mg/kg

Parameter ¹	Males ($n = 5$)	Females ($n = 5$)
C_{\max} (ng/ml)	12.72 ± 5.13	22.65 ± 11.95
T_{\max} (days)	4.86 ± 3.56	5.20 ± 1.87
$t_{1/2\alpha}$ (days)	1.50 ± 1.40	1.81 ± 0.99
$t_{1/2\beta}$ (days)	12.14 ± 6.55	10.73 ± 4.68
MRT (days)	12.56 ± 3.27	12.54 ± 2.11
AUC (ng.day/ml)	192.08 ± 63.85	$370.97 \pm 146.87^*$
Cl_B/F (ml/kg per day)	$34\,596.00 \pm 12\,736$	$18\,185.00 \pm 6377^*$

^a C_{\max} , observed peak plasma concentration; T_{\max} , time to reach C_{\max} ; $t_{1/2\alpha}$, initial half-life; $t_{1/2\beta}$, terminal half-life; MRT, mean residence time; AUC, area under the plasma concentration–time curve; Cl_B/F , observed body clearance

*Significant difference between males and females ($p < 0.05$)

12.72 ng/ml in males was considerably lower than that of 22.6 ng/ml determined in females. However, the difference was not significant owing to a large variability (SD).

Sarasola and colleagues (2002) reported no differences between male and female dogs for the C_{max} and AUC after topical application. Furthermore, the AUC (634 ng.day/ml) obtained after topical application of 24 mg/kg to dogs was of the same magnitude as the value reported in the present study, considering the difference in dose administered (6 mg/kg). However, in males the value (192 ng.day/ml) was lower than that obtained in females (370 ng.day/ml). The most surprising result reported by Sarasola and colleagues was the mean absolute bioavailability of selamectin in dogs following topical administration: 4.4% instead of 74% in cats. Some hypotheses were presented to explain the great difference of bioavailability between dogs and cats (transdermal blood flux, cat skin properties, grooming habit of cats). Such a great variability in pour-on formulations of endectocides is of major concern. The terminal half-life in our study (11–12 days) is much higher than that obtained by Sarasola and colleagues (2002) after intravenous administration of selamectin in dogs (14 h). This large difference could be due to the long process of absorption.

In this study, the clearance (Cl_B/F) of selamectin was significantly higher in males than in females. The higher plasma drug concentrations in female dogs could be related to differences in bioavailability and/or clearance of the drug. Regarding clearance, this phenomenon was previously described in female rats after repeated oral administration of selamectin; in contrast, the exposure to selamectin resulted in higher values in male than in female dogs (Pillai *et al.*, 2000). Some hypotheses are conceivable to explain our results. The first concerns a metabolic difference linked to sex: male dogs may exhibit a higher metabolic clearance. A second might be related to a higher fat content in females, which acts as a slow-release reservoir. The last could be correlated with oral bioavailability. Indeed, the difference could be associated with a licking behaviour previously described for ivermectin in cattle (Laffont *et al.*, 2001): female dogs may have a more pronounced grooming habit.

Finally, the results obtained in the present investigation may have therapeutic implications owing to variation in bioavailability of selamectin between male and female dogs. Furthermore, it appears interesting to correlate these pharmacokinetic results with those of efficacy studies in order to adapt the appropriate posology to specific animals.

REFERENCES

- Alvinerie, M., Sutra, J.F., Badri, M. and Galtier, P., 1995. Determination of moxidectin in plasma by high-performance liquid chromatography with automated solid phase extraction and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **674**, 119–124
- Laffont, C.M., Alvinerie, M., Bousquet-Melou, A. and Toutain, P.L., 2001. Licking behaviour and environmental contamination arising from pour-on ivermectin for cattle. *International Journal for Parasitology*, **31**, 1687–1692
- MacKellar, Q.A. and Benchaoui, H.A., 1996. Avermectins and milbemycins. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **19**, 331–351

- McTier, T.L., Jernigan, A.D., Rowan, T.G., Holbert, M.S., Smothers, C.D., Bishop, B.F., Evans, N.A., Gration, K.A.F. and Giles, C.J., 2000. Dose selection of selamectin for efficacy against adult fleas (*Ctenocephalides felis felis*) on dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, **91**, 177–185
- Mugford, C.A. and Kedderis, G.L., 1998. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metabolism Reviews*, **30**, 441–498
- Novotny, M.J., Krautmann, M.J., Ehrhart, J.C., Godin, C.S., Evans, E.I., McCall J.W., Sun F., Rowan T.G. and Jernigan, A.D., 2000. Safety of selamectin in dogs. *Veterinary Parasitology*, **91**, 377–391
- Pillai, U., Harran, L., Blackwell, D. and Updike, L., 2000. Toxicokinetics of selamectin in rats and dogs. In: S. Soback and Q. McKellar (eds), *Proceedings of the 8th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT)*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **23**, supplement 1
- Rowland, M. and Tozer, T.N., 1995. *Clinical Pharmacokinetics, Concepts and Application*, (Williams and Wilkins, Baltimore, MD), 60
- Sarasola, P., Jernigan, A.D., Walker, D.K., Castledine, J., Smith, D.G. and Rowan, T.G., 2002. Pharmacokinetics of selamectin following intravenous, oral and topical administration in cats and dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **25**, 265–272.
- Shoop, W.L., Mrozik, H. and Fisher, M.H., 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, **59**, 139–156
- Sutra, J.F., Cadiergues, M.C., Dupuy, J., Franc, M. and Alvinerie, M., 2001. Determination of selamectin in dog plasma by high-performance liquid chromatography with automated solid phase extraction and fluorescence detection. *Veterinary Research*, **32**, 455–461
- Toutain, P.L., Upson, D.W., Terhune, T.N. and McKenzie, M.E., 1997. Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in cattle. *Veterinary Parasitology*, **72**, 3–8
- Yamaoka, K., Tanigawara, K., Nakacawa, T. and Uno, T., 1981. A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, **4**, 879–885

(Accepted: 29 April 2003)

Principe du test de Student :

(d'après le site web : ww.santetropicale.com/SANTEMAG/algerie/stat/stat_2.htm#7)

1/ Ranger les valeurs sous forme de tableau

Noter le nombre N1 de données de la première série et le nombre N2 de données de la deuxième série.

2/ Calculer les moyennes et les écarts types de chacune des séries :

$$\text{Moyenne} = \frac{\sum x_i}{N}$$

$$\text{Ecart - type} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \text{moyenne})^2}{N - 1}}$$

3/ Calculer la variance totale :

$$S^2 = \frac{(N_1 \times \sigma_1^2) + (N_2 \times \sigma_2^2)}{(N_1 + N_2) - 2}$$

4/ Calcul du t de Student :

$$t = \frac{|\text{moyenne}_1 - \text{moyenne}_2|}{S \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

5/ Comparer le t calculé au t de la table, avec un degré de liberté $\nu = N_1 + N_2 - 2$

Si t calculé est supérieur au t de la table, il existe une différence significative.

Si t calculé est inférieur au t de la table, il n'existe pas de différence significative.

Table du t de Student

v = degré de liberté	P = 95 %	P = 99 %
1	12.706	63.657
2	4.303	9.925
3	3.182	5.841
4	2.776	4.604
5	2.571	4.032
6	2.447	3.707
7	2.365	3.499
8	2.306	3.355
9	2.262	3.250
10	2.228	3.169
11	2.201	3.106
12	2.179	3.055
13	2.160	3.012
14	2.145	2.977
15	2.131	2.947
16	2.120	2.921
17	2.110	2.898
18	2.101	2.878
19	2.093	2.861
20	2.086	2.845
21	2.080	2.831
22	2.074	2.819
23	2.069	2.807
24	2.064	2.797
25	2.060	2.787
26	2.056	2.779
27	2.052	2.771
28	2.048	2.763
29	2.045	2.756
30	2.042	2.750
40	2.021	2.704
60	2.000	2.660
120	1.980	2.617
∞	1.960	2.576

D'après le site web : www.santetropicale.com/SANTEMAG/algerie/stat/stat_8.htm#21

Précision inter-journalière des dosages des échantillons plasmatiques.

(Calculée à partir des valeurs des gammes étalon réalisées pour chaque chien, c'est-à-dire refaites avant chaque dosage d'une série d'échantillons)

[Séla] _{gamm} e (ng/mL)	[Séla] _{calculée} (ng / mL)									
	CN 968	CN 191	CN 501	CN 506	CN 764	CN 872	CN OHJ4	CN 500	CN 567	CN 693
0,5	0,431	0,493	0,507	0,483	0,508	0,495	0,493	0,516	0,512	0,518
1	1,238	1,046	0,988	1,063	0,979	1,000	1,031	0,935	0,958	0,926
2,5	2,614	2,428	2,349	2,460	2,414	2,612	2,468	2,425	2,494	2,497
5	5,592	4,916	5,179	5,288	4,964	5,042	5,043	5,295	4,735	4,946
10	10,469	9,831	10,141	9,845	10,298	10,119	10,043	10,012	10,518	10,204
25	21,496	24,217	25,398	25,833	25,025	25,023	24,593	24,963	25,145	26,309
50	41,448	53,145	49,640	45,526	50,779	47,182	49,943	50,186	50,798	48,822

[Séla] _{gamme} (ng/mL)	moyenne des conc.	écart type	précision CV
0,5	0,496	0,025	5,13%
1	1,016	0,090	8,87%
2,5	2,476	0,084	3,39%
5	5,100	0,245	4,79%
10	10,148	0,233	2,30%
25	24,800	1,302	5,25%
50	48,747	3,301	6,77%
		5,21%	0,754

Précision intra-journalière des dosages des échantillons plasmatiques.

(Calculée à partir des valeurs des doublets réalisés dans chaque série d'échantillons analysés)

		Chiens mâles				
		CN 968	CN 191	CN 501	CN 506	CN 764
Concentration (ng /mL)			0	< [Séla] <	26,675	
Précision		2,153%	0,596%		0,942%	1,839%
sur		0,034%	0,443%	0,051%	0,797%	0,659%
doublets			0,606%	2,956%	2,540%	0,450%
			0,377%	4,293%	3,516%	3,161%
Précision : CV ± σ			0,015	% ±	0,013	

		Chiens femelles				
		CN 872	CN OHJ4	CN 500	CN 567	CN 693
Concentration (ng /mL)			0	< [Séla] <	0	
Précision		0,757%	24,307%	2,358%	10,340%	2,345
sur		3,848%	5,001%	1,992%	5,057%	3,100%
doublets		1,277%	3,285%	0,586%	0,120%	5,167%
		4,200%	2,094%	2,063%	10,356%	2,258%
Précision : CV ± σ			0,161	% ±	0,517	

Chiens totaux	0,05001 < [Sélamectine] < 0,05057
	0,090 % ± 0,149

Toulouse, 2006

NOM : DERLON

PRENOM : Anne-Laure

TITRE : Etude pharmacocinétique de l'influence du sexe sur le profil plasmatique de la sélamectine chez le chien.

La sélamectine est un antiparasitaire polyvalent développé pour le chien et le chat sous le nom déposé Stronghold®. Cet endectocide dérivé de la doramectine, est le premier membre de la famille des avermectines présentant une bonne sécurité d'utilisation combinée à une bonne efficacité à la fois sur les parasites internes et externes des animaux de compagnie.

Après une étude bibliographique des propriétés physico-chimiques et des indications thérapeutiques de la sélamectine, le travail de l'auteur a consisté à explorer l'influence du sexe sur la rémanence de cette molécule chez le chien grâce à une étude pharmacocinétique. Dix chiens de race Beagle répartis en deux groupes de cinq mâles et cinq femelles, ont été traités selon le même protocole : une application en spot-on d'une dose de 6 mg/kg de sélamectine puis plusieurs prises de sang selon un calendrier précis.

Les résultats présentés par l'auteur dénotent l'existence d'une différence significative entre mâles et femelles concernant deux paramètres pharmacocinétiques : l'AUC est plus grande chez les femelles ($370,97 \pm 146,87$ ng.jour/mL) que chez les mâles ($192,08 \pm 63,85$ ng.jour/mL) et la clairance est plus faible chez les femelles ($18\ 185 \pm 6\ 377$ mL/kg/jour) que chez les mâles ($34\ 596 \pm 12\ 736$ mL/kg/jour).

L'auteur expose ensuite les hypothèses pouvant justifier cette différence de rémanence entre chiens mâles et chiens femelles. Il envisage enfin l'intérêt et les perspectives des résultats obtenus sur ce nouvel endectocide.

MOTS CLES : Sélamectine / Antiparasitaire / Endectocide / Avermectine / Chien / Pharmacocinétique / Influence du sexe

TITLE : Pharmacokinetics of sex-influence in selamectin plasmatic pattern in dogs.

ABSTRACT : The selamectin is an antiparasitic agent licensed for dogs and cats with the name of Stronghold®. This endectocide is the first avermectin that has a combination of safety and potency against both external and internal parasites in companion animals.

After presenting a review of the molecule properties and its clinical indications, the author presents his work : ten dogs (5 males and 5 females) received a topical application (spot-on) of selamectin at a dose rate of 6 mg/kg body weight ; then, plasma samplers were analysed to determine the drug concentration versus time over 35 days. This study reveals a significant sex-influence concerning two pharmacokinetic parameters : the area under the concentration-time curve (AUC) which is higher in females, and the clearance which is more important in males. Finally, the author exposes some hypotheses in order to explain his results and shows the interest and perspectives of such results.

KEY WORDS : Selamectin / Antiparasitic agent / Endectocide / Avermectin / Dog / Pharmacokinetics / Sex-influence