

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2016

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement
le 23 juin 2016 à POITIERS
par Mademoiselle CARRERE Louise
née le 22 Octobre 1990

Étude pharmacocinétique de l'ivermectine administrée par voies orale et intramusculaire à la dose de 400 µg/kg, chez les Callithricidés, réalisée au Zoo de La Palmyre en Charente Maritime

Composition du jury :

Président : Madame le Professeur Christine IMBERT

Directeur de thèse : Madame le Professeur Sandrine MARCHAND

Membres : Monsieur Lydwin HOUNKANLIN - Maître de conférences associé
Monsieur Guillaume VIGNON - Pharmacien biologiste



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- JORDAN Steven

Poste d'ATER

- COSTA Damien

Poste de Moniteur

- VERITE Julie

REMERCIEMENTS

À Madame Christine IMBERT,

Professeur de Parasitologie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Poitiers,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse,
Avec mes hommages respectueux.

À Madame Sandrine MARCHAND,

Professeur de Pharmacocinétique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Poitiers,
Qui a accepté de diriger cette thèse et m'a encouragée dans le choix de ce sujet.
Merci pour vos conseils précieux lors de la conception et réalisation de mon travail.

À Monsieur Lydwin HOUNKANLIN,

Maître de Conférences Associé à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Poitiers,
Merci pour l'intérêt que tu as porté à mon travail depuis le début et ta présence amicale.
C'est un plaisir de te compter parmi les membres de mon jury.
La qualité de ton enseignement me permet d'aborder mon métier de pharmacien d'officine avec confiance.

À Monsieur Guillaume VIGNON,

Pharmacien biologiste, Praticien Hospitalier au Laboratoire Inter Hospitalier GCS de Saintonge, site de Royan.
Merci d'avoir accepté de siéger dans mon jury,
En toute amitié.

À Monsieur Thierry PETIT,

Docteur Vétérinaire au Zoo de La Palmyre (commune des Mathes-La Palmyre, Charente-Maritime),
Vous avez répondu favorablement à ma sollicitation concernant la réalisation d'une thèse de pharmacie sur un sujet de pharmacologie vétérinaire.
Merci de m'avoir proposé ce sujet et d'en avoir élaboré le protocole de réalisation.
Votre disponibilité et vos conseils m'ont grandement aidée dans l'avancement de ma thèse.
J'ai été très honorée de faire ce travail à vos côtés,
Recevez toute ma reconnaissance.

À Monsieur Patrick CAILLÉ,
Président du Zoo de La Palmyre,
Pour m'avoir accueillie dans son parc zoologique et pour avoir contribué à la réalisation de cette étude.

À Monsieur Pierre CAILLÉ,
Directeur du Zoo de La Palmyre,
Merci de ton accueil amical et de m'avoir mise en relation avec le Docteur PETIT.
Pour ta gentillesse et ton aide précieuse qui m'ont permis d'accéder au zoo et de réaliser les photos illustrant ce travail.
Avec toute mon amitié.

À Madame Anne LESPINE,
Directeur de Recherche au Laboratoire TOXALIM du centre INRA de Toulouse,
Pour avoir aussitôt accepté de s'investir dans ce projet, ainsi qu'à Jean-François SUTRA et à l'équipe du laboratoire pour la réalisation des dosages HPLC.

À Gwendoline ANFRAY,
Pour sa participation aux manipulations des animaux.

À ma famille,
Qui m'entoure, me soutient depuis le tout début et sait être présente dans toutes les épreuves d'une vie. Une pensée particulière pour mes quatre grands-parents.

À mes parents.
Vous m'avez soutenue à chaque instant, m'avez aidé à réaliser mes études et avez toujours fait tout votre possible pour m'offrir le meilleur dans la vie. Je suis fière de tout ce que vous m'avez apporté au travers de votre amour et votre présence. Il est désormais temps de penser à vous. Je vous aime. Merci.

À Jean, mon frère,
Pour nos moments passés ensemble, enfants, et ceux à venir.

À Laure,
Qui m'a soutenue tant professionnellement qu'amicalement pendant la réalisation de ce travail et pour ton aide et ta présence affectueuse.

À Marie et Matthieu,

Pour votre gentillesse et votre disponibilité.

À Sylvain et Julie,

Merci pour votre amitié et ces moments passés ensemble au cours de nos longues années d'études.

À Sarah

Pour son amitié et son soutien indéfectibles. Pour cette rencontre peu commune et merveilleuse.

À Cachou

Pour sa présence quotidienne qui me donne le sourire et l'entrain nécessaires chaque jour.

PLAN

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I – Généralités : Recherches bibliographiques.....	3
I.1. L'Ivermectine.....	3
I.1.1. Origine.....	3
I.1.2. Structure chimique.....	5
I.1.3. Propriétés physico-chimiques.....	7
I.1.4. Propriétés pharmacologiques.....	8
I.1.4.1. Mode d'action.....	8
I.1.4.2. Spectre.....	9
I.1.4.3. Utilisation et posologies usuelles.....	11
I.1.5. Propriétés pharmacocinétiques.....	11
I.1.6. Toxicité.....	14
I.2. Les Callithricidés.....	15
I.2.1. Généralités.....	15
I.2.2. Description.....	21
I.2.3. Programmes de sauvegarde.....	23
I.3. Le parasite : <i>Parastrongylus dujardini</i>	25
I.3.1. Généralités.....	25

I.3.2. Cycle évolutif de <i>Parastrongylus dujardini</i>	26
I.3.3. Données chez le singe.....	28
Chapitre II – Travail personnel : Matériels et méthodes.....	30
II.1. Animaux utilisés.....	30
II.2. Médicaments et doses utilisés.....	33
II.3. Expérimentations.....	33
II.3.1. Préparation des doses.....	34
II.3.1.1. Voie orale dans un aliment appétent ou voie orale « gâteau ».....	34
II.3.1.2. Voie intramusculaire	35
II.3.1.3. Voie orale forcée à la seringue.....	35
II.3.2. Administrations.....	35
II.3.2.1. Voie orale dans un aliment appétent ou voie orale « gâteau ».....	36
II.3.2.2. Voie intramusculaire	36
II.3.2.3. Voie orale forcée à la seringue.....	36
II.3.3. Prélèvements.....	37
II.3.3.1. Établissement du protocole.....	37
II.3.3.2. Anesthésies.....	38
II.3.3.3. Volumes prélevés.....	38

II.3.3.4. Déroulement des prélèvements.....	39
II.3.3.5. Préparation des échantillons.....	39
II.4. Analyse HPLC.....	40
II.4.1. Principe de la méthode.....	40
II.4.2. Consignes de sécurité et gestion des déchets.....	41
II.4.3. Réception, stockage et distribution des échantillons.....	41
II.4.4. Protocole d'analyse.....	41
II.4.4.1. Extraction de l'ivermectine.....	41
II.4.4.2. Préparation des solutions de dérivation.....	42
II.4.4.3. Dérivation.....	42
II.4.5. Les réactifs HPLC.....	43
II.4.6. Le système HPLC.....	44
II.4.7. Validation de la méthode.....	45
II.5. Analyse pharmacocinétique.....	46
Chapitre III – Résultats et discussion.....	48
CONCLUSION.....	54
GLOSSAIRE.....	55
BIBLIOGRAPHIE.....	67

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Classification des lactones macrocycliques.....</i>	<i>4</i>
<i>Figure 2 : Streptomyces avermitilis.....</i>	<i>4</i>
<i>Figure 3 : Structure des avermectines.....</i>	<i>6</i>
<i>Figure 4 : Structure de l'ivermectine.....</i>	<i>7</i>
<i>Figure 5 : Mécanisme d'action de l'ivermectine dans la fente synaptique.....</i>	<i>8</i>
<i>Figure 6 : Pharmacocinétique de l'ivermectine.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 7 : Classification des Callithricidés.....</i>	<i>15</i>
<i>Figure 8 : L. chrysomelas – Tamarin lion à tête dorée. Zoo de La Palmyre.....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 9 : L. rosalia – Tamarin lion doré. Zoo de La Palmyre.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 10 : C. goeldii – Tamarin de Gould. Zoo de La Palmyre.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 11 : Classification de Parastrongylus dujardini.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 12 : Schéma de principe d'une chaîne d'HPLC.....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 13 : Evolution des concentrations plasmatiques d'ivermectine en fonction du temps après administrations orale dans un gâteau, orale à la seringue et intramusculaire à la dose de 400 µg/kg. a) en coordonnées décimales. b) en coordonnées semi-logarithmiques</i>	<i>48</i>
<i>Figure 14 : Extrapolation des AUC.....</i>	<i>51</i>

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Liste non exhaustive des parasites sensibles à l'ivermectine à au moins un stade de leur développement.....</i>	<i>9</i>
<i>Tableau 2 : Tableau des différentes espèces de Callithricidés.....</i>	<i>16</i>
<i>Tableau 3 : Tableau d'identification des individus.....</i>	<i>32</i>
<i>Tableau 4 : Valeurs moyennes des concentrations plasmatiques en ivermectine pour chaque voie d'administration.....</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 5 : Valeurs des différents paramètres pharmacocinétiques étudiés, pour chaque voie.....</i>	<i>49</i>

LISTE DES ANNEXES

<i>Annexe 1a : Papilles à l'extrémité de la queue de la femelle de Parastrongylus dujardini...</i>	<i>57</i>
<i>Annexe 1b : Côtes latérales partant du tronc commun chez le mâle de Parastrongylus dujardini.....</i>	<i>57</i>
<i>Annexe 2 : Morphologies de P. dujardini selon ses stades larvaires jusqu'à sa forme adulte.....</i>	<i>58</i>
<i>Annexe 3 : Volumes à administrer.....</i>	<i>60</i>
<i>Annexe 4 : Gâteau distribué aux animaux.....</i>	<i>61</i>
<i>Annexe 5 : Administration orale à la seringue.....</i>	<i>62</i>
<i>Annexe 6 : Anesthésie gazeuse.....</i>	<i>63</i>
<i>Annexe 7 : Anesthésie de L. chrysomelas.....</i>	<i>64</i>
<i>Annexe 8 : Prélèvement sanguin.....</i>	<i>65</i>
<i>Annexe 9 : Pourcentages d'extrapolation des AUC.....</i>	<i>66</i>

ABREVIATIONS

ACN : Acétonitrile

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AUC : Area Under the Curve

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

γ GT : Gamma-glutamyltransférase

HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

IM : Intramusculaire

LM : Lactones Macrocycliques

PO : Per Os

QSP : Quantité Suffisante Pour

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

SC : Sous-Cutané

UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature

INTRODUCTION

Depuis quelques années, le zoo de La Palmyre (Charente-Maritime), ainsi que trois autres parcs zoologiques en France (la réserve zoologique de Calviac en Dordogne, le safari de Peaugres en Ardèche et le zoo de Pont Scorff dans le Morbihan) ont constaté une mortalité importante chez les singes de la famille des Callithricidés. Après autopsie puis analyse anatomopathologique des individus décédés, il a été retrouvée une infestation helminthique par le nématode *Parastrongylus dujardini*.

Il s'agit d'une pathologie émergente en France. En effet, ce ver infeste habituellement les rongeurs autochtones mais depuis quatre ans il s'est adapté à différentes espèces de primates en captivité. Le Docteur PETIT, vétérinaire du zoo, a disséqué de nombreux rongeurs et autres petits mammifères (souris, musaraignes) piégés ou retrouvés morts dans le zoo et a ainsi mis en évidence la présence ce ver chez ces individus. Ce parasite constitue un danger pour la santé des singes si ces infestations ne sont pas prévenues ou traitées correctement. Les animaux infestés présentent des insuffisances cardiaques droites, des obstructions de l'artère pulmonaire par les vers, ainsi que des pneumonies conduisant au décès [1].

Ces cas d'infestations cardiopulmonaires par *Parastrongylus dujardini* sont les premiers formellement décrits chez des Callithricidés au monde [1].

Notre étude concerne trois espèces de tamarins, présentes au zoo de La Palmyre : Tamarin lion doré *Leontopithecus rosalia*, Tamarin lion à tête dorée *Leontopithecus chrysomelas*, Tamarin de Gould *Callimico goeldii*.

Afin d'essayer d'enrayer les infestations, les singes sont traités par un antiparasitaire : l'ivermectine. Malgré un traitement préventif administré toutes les trois semaines sous différentes voies d'administration (orale, sous-cutanée ou intramusculaire) les vers persistent dans l'organisme et maintiennent une mortalité élevée dans les populations de singes [2].

Face à ce problème, nous décidons de rechercher le mode d'administration qui permettrait d'obtenir la meilleure concentration sanguine d'ivermectine présentant une activité anti-parasitaire. Il ne s'agit pas d'étudier ici l'activité spécifique de l'ivermectine vis-à-vis de

Parastrongylus dujardini ni de déterminer la concentration plasmatique minimale efficace, mais de suivre l'évolution des concentrations plasmatiques du médicament selon les différentes voies d'administration testées. Ainsi le vétérinaire choisira le mode d'administration le plus approprié pour traiter les animaux.

Trois modes d'administration sont envisageables : la prise en autonomie par l'animal dans un aliment appétent distribué au groupe, la prise orale individuelle forcée à la seringue et l'injection intramusculaire.

À notre connaissance, il n'existe actuellement dans la littérature, aucune étude portant sur la pharmacocinétique de l'ivermectine chez les Callithricidés concernés par notre travail. Nous devons donc établir des protocoles d'administration de l'ivermectine et de prélèvements sanguins afin de pouvoir mener notre propre étude.

L'exposé se compose de trois parties :

Une première partie bibliographique décrit l'anthelminthique ivermectine, les Callithricidés ainsi que le parasite *Parastrongylus dujardini*.

Nous exposons ensuite le travail expérimental : la préparation des protocoles ainsi que leur mise en place.

Enfin les résultats sont analysés et discutés en notant les différents biais et problèmes rencontrés.

CHAPITRE I – Généralités : Recherches bibliographiques

I.1 L'ivermectine

I.1.1. Origine

Dans les années 1970 une campagne de recherche par criblage de nouvelles molécules antiparasitaires est lancée.

Des micro-organismes telluriques ont été récoltés à travers le monde puis mis en culture en laboratoire.

Des tests *in vitro* ont montré une activité antiparasitaire faible de certaines de ces cultures. Puis des tests *in vivo* sur des souris infestées du nématode (*glossaire*) *Nematospiroides dubius* se révèlent concluant quant à cette activité.

Les recherches aboutissent en 1979 avec l'isolement de molécules ayant une activité très supérieure aux autres anthelminthiques connus à ce jour. Elles font partie de la famille des lactones macrocycliques (LM) appelées avermectines.

Elles possèdent une action contre les endoparasites (helminthes) et les ectoparasites (insectes et acariens). L'origine du mot « *avermectine* » s'explique comme suit :

« *a* » : *anti* / « *ver*m » : *ver* / « *ect* » : *ectoparasites* / « *ine* » : *produit pharmaceutique*

Cette famille de molécules contient plusieurs principes actifs dont l'ivermectine à laquelle nous nous intéressons dans notre travail (*Figure 1*).

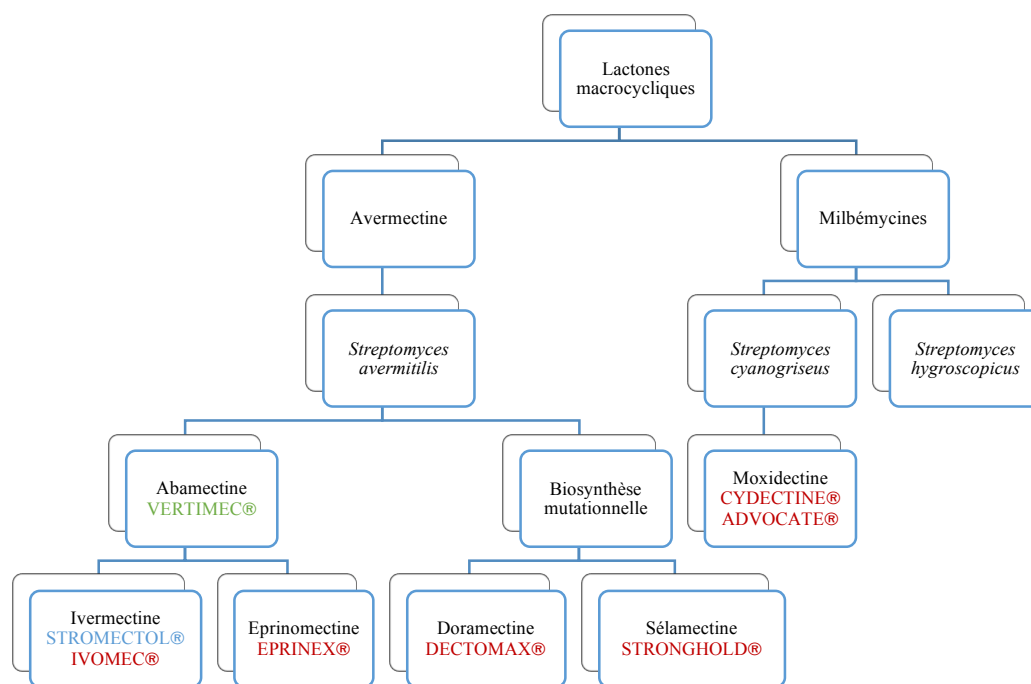


Figure 1 : Classification des lactones macrocycliques avec un exemple de spécialité contenant chaque principe actif ■ pour les spécialités vétérinaires ■ pour les spécialités utilisées en médecine humaine ■ pour les spécialités phytosanitaires [3]

Les avermectines sont naturellement produites par la fermentation d'un actinomycète du sol (bactérie filamenteuse) : *Streptomyces avermitilis* (Figure 2).

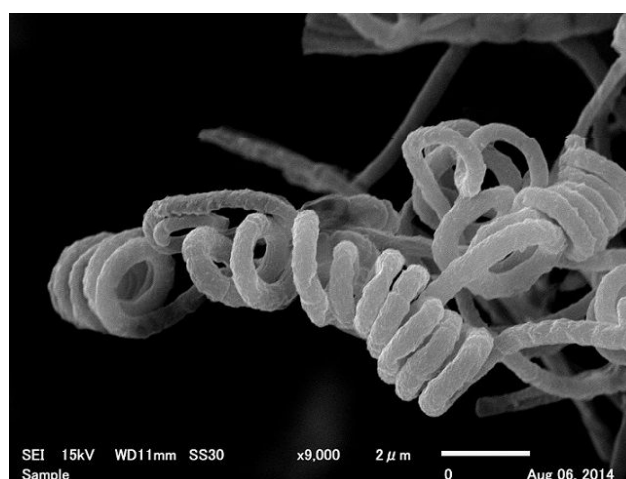


Figure 2 : *Streptomyces avermitilis* [4]

Cette souche reste la principale base de production de l'ivermectine car sa synthèse complète nécessiterait une cinquantaine d'étapes [5].

L'ivermectine est commercialisée pour la première fois pour l'usage vétérinaire en 1981 par les laboratoires MERIAL sous la forme d'IVOMEC Bovin®. Puis elle obtient son autorisation de mise sur le marché (AMM) en médecine humaine en 1999 sous forme de comprimés STROMEKTOL® par les laboratoires MSD [6].

I.1.2. Structure chimique

Les avermectines sont produites sous la forme d'un mélange de 8 composés A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a et B2b [7] (*Figure 3*) où :

A : groupe méthoxy en 5 (CH₃)

B : groupe hydroxy en 5 (OH)

- 1 : double liaison entre 22 et 23

- 2 : pas de double liaison entre 22 et 23 et un OH en 23

- a : une chaîne secondaire butyle en 25

- b : une chaîne isopropyle en 25

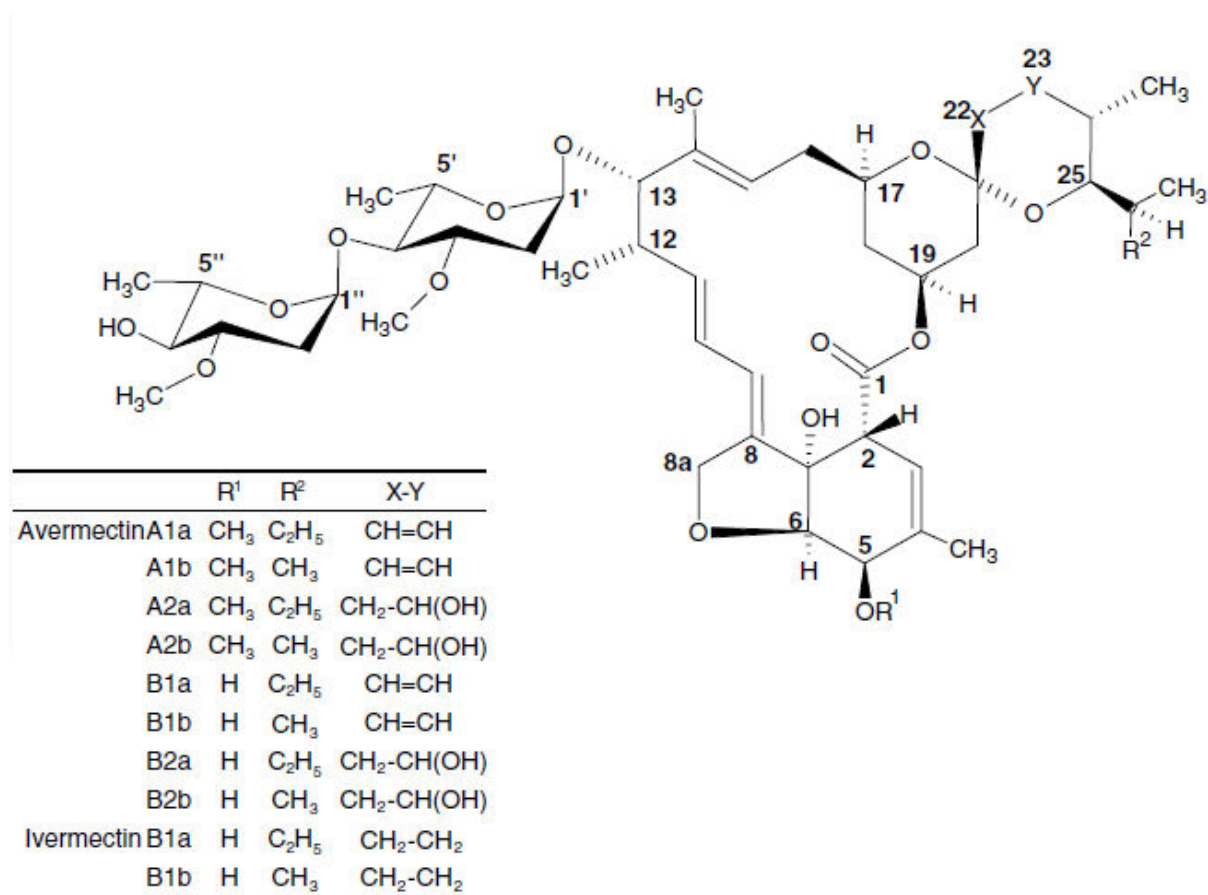


Figure 3 : Structure des avermectines [8]

L'ivermectine a été obtenue par hydrogénation sélective de la double liaison C 22-23, d'où son autre nom : 22,23-dihydro-avermectine B1 (*Figure 4*).

Elle est précisément formée de deux composés homologues et contient au moins 80% de 22,23-dihydro-avermectine B1a et au plus 20% de 22,23-dihydro-avermectine B1b.

Il est impossible de séparer les composés 22,23-dihydro-avermectine B1a et 22,23-dihydro-avermectine B1b, cependant ils posséderaient une activité quasi identique [9].

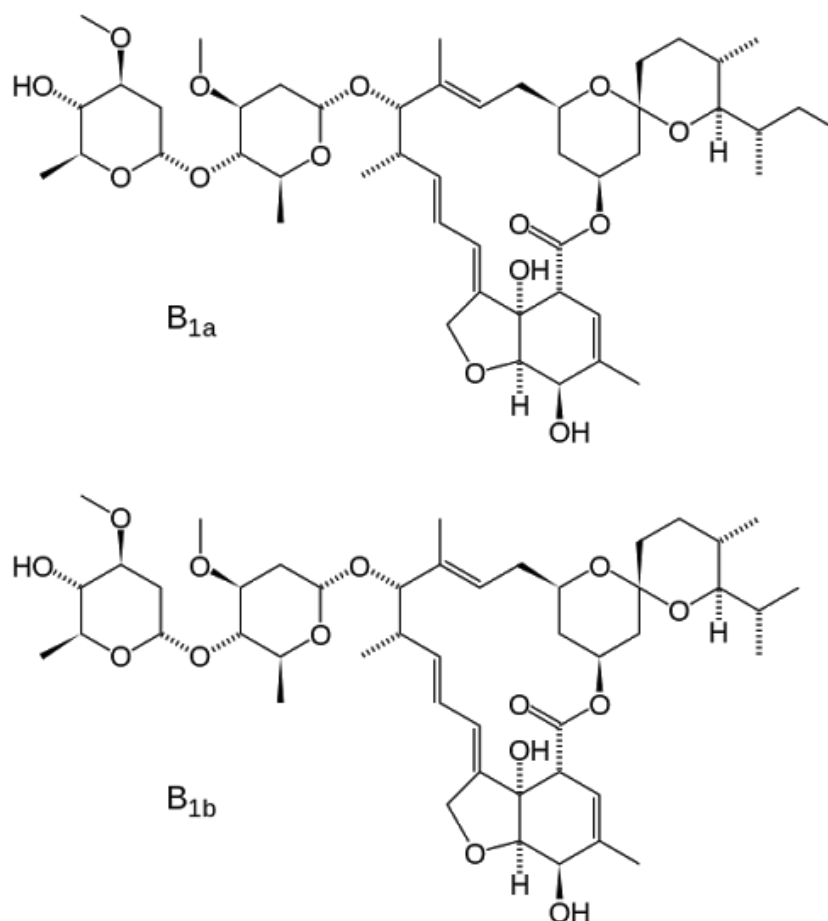


Figure 4 : Structure de l'ivermectine [10]

I.1.3. Propriétés physico-chimiques

À l'état pur, l'ivermectine se présente comme une poudre cristalline, non hygroscopique, blanche-jaune (*Pharmacopée Européenne, 1996*).

Elle est insoluble dans l'eau mais soluble dans la plupart des solvants organiques comme le méthanol et l'éthanol à 95°.

Sa masse molaire est de 875,10 g/mol et son point de fusion se situe autour de 150°C.

Elle est très peu hydrophile mais est lipophile.

Elle est dégradée par la lumière solaire, une exposition aux ultra-violets isomérise les doubles liaisons [11].

I.1.4. Propriétés pharmacologiques

I.1.4.1. Mode d'action

Cette molécule possède une activité neurotoxique sur les formes larvaires et/ou adultes des parasites.

Après pénétration dans l'organisme par voie transcuticulaire ou orale [12], l'ivermectine se fixe sur la sous-unité α des canaux chlorure glutamate-dépendants des cellules nerveuses et musculaires du parasite. Ceci entraîne une ouverture des canaux, ils deviennent perméables aux ions chlorures entraînant une paralysie musculaire flasque et un blocage de la transmission nerveuse (*Figure 5*).

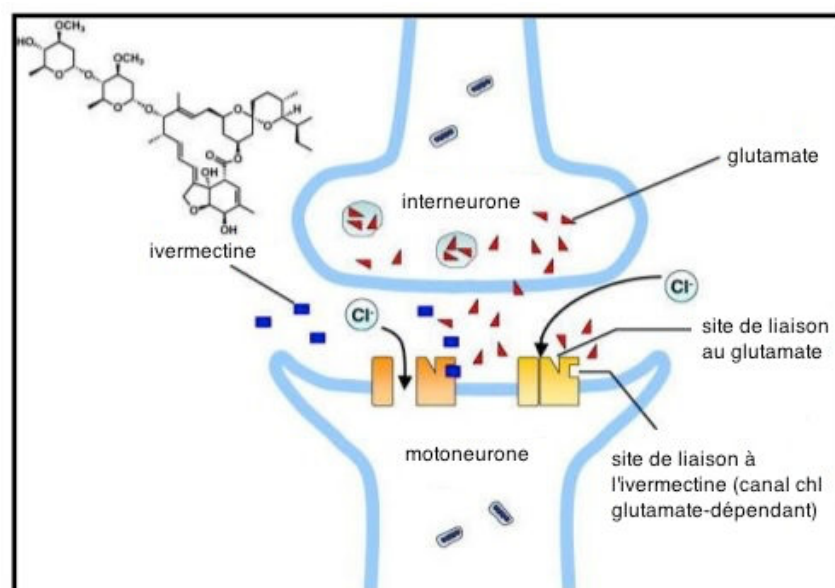


Figure 5 : Mécanisme d'action de l'ivermectine dans la fente synaptique [13]

Ces canaux chlorure glutamate-dépendants n'ont pas été retrouvés chez les mammifères [14] ce qui explique une faible toxicité et une utilisation très répandue de la molécule. De plus elle passe difficilement la barrière hémato-encéphalique (BHE) de par son poids moléculaire élevé.

L'ivermectine interagit parallèlement avec les canaux chlorure GABA-dépendants. Pour être stimulés, ils nécessitent des concentrations d'ivermectine plus élevées que pour les canaux chlorure-glutamate dépendants. Mais l'importance de ces récepteurs dans l'activité de l'ivermectine reste peu claire [15].

I.1.4.2. Spectre

L'ivermectine est la première avermectine commercialisée et possède le plus large spectre d'activité (*Tableau 1*), certaines reconnues par des AMM. En médecine humaine elle a une AMM pour la strongyloïdose (anguillulose) gastro-intestinale, la microfilarémie à *Wuchereria bancrofti* et la gale sarcoptique.

Chez les endoparasites elle possède une activité uniquement sur les nématodes. Les cestodes et les trématodes (*glossaire*) ne possèdent pas de canaux chlorure glutamate-dépendants, rendant ainsi l'ivermectine inefficace chez eux.

Tableau 1 : Liste non exhaustive des parasites sensibles à l'ivermectine à au moins un stade de leur développement [7]

Classe	Ordre	Famille/Superfamille	Genre
Nematoda	Strongylida	Trichostrongyloidea	<i>Cooperia, Haemonchus, Hyostrongylus, Nematodirus, Nematospiroides, Ostertagia, Trichostrongylus</i>
		Strongyloidea	<i>Ankylostoma, Bunostomum, Chabertia, Cyathostomum, Cylicodontophorus, Cylicocyclus, Cylicostephanus, Gaigeria, Gyalocephalus, Mecistocirrus, Oesophagodontus, Oesophagostomum, Poteriosomum, Stephanurus, Strongylus, Triodontophorus, Uncinaria</i>
		Metastrongyloidea	<i>Dictyocaulus, Metastrongylus</i>
	Rhabditida	Rhabditoidea	<i>Strongyloides</i>
	Ascaridida	Ascaridoidea	<i>Ascaridia, Ascaris, Heterakis, Parascaris, Toxascaris, Toxocara</i>
	Oxyurida	Oxyuroidea	<i>Aspiculuris, Oxyuris, Syphacia</i>
	Spirurida	Spiruroidea	<i>Draschia, Habronema, Thelazia</i>
		Filaroidea	<i>Brugia, Dipetalonema, Dirofilaria, Litomosoides, Onchocerca, Parastrongylus, Setaria, Wuchereria</i>
	Enoplida	Trichuroidea	<i>Capillaria, Trichinella, Trichuris</i>

Insecta	Diptera	Cyclorapha	<i>Chrysomyia, Cuterebra, Dermatobia, Gasterophilus, Hypoderma, Lucilia, Oestrus, Glossina</i>
	Phtiraptera	Anoplura	<i>Haematopinus, Linognathus, Solenoptes</i>
		Mallophaga	<i>Damalinia</i>
	Siphonaptera	Pulicidea	<i>Xenopsylla</i>
Arachnida	Acarina	Gamasiformes	<i>Ornithonyssus</i>
		Trombidiformes	<i>Psorergates</i>
		Sarcoptiformes	<i>Chorioptes, Otodectes, Psoroptes, Sarcoptes</i>
		Ixodiformes	<i>Amblyomma, Boophilus, Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma, Ornithodoros, Rhipicephalus</i>
		Ixodiformes	<i>Amblyomma, Boophilus, Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma, Ornithodoros, Rhipicephalus</i>

À ceci nous pouvons ajouter le nématode filiforme *Loa loa* [17] (*glossaire*), ainsi que le pou *Pediculus humanus* sensible par voie orale ou en lotion sur le cuir chevelu [18] [19].

Nous nous intéressons dans cette étude à un helminthe Angiostrongylidae, *Parastrongylus dujardini*. Sa sensibilité à l'ivermectine n'est pas connue mais plusieurs études montrent que des nématodes du genre *Parastrongylus* sont sensibles aux avermectines [20] [21].

Le choix de l'utilisation de l'ivermectine dans notre travail est conforté par :

- La publication de MJ. Adkesson [22] montrant l'intérêt de l'ivermectine dans l'infestation de Callithricidés (dont les 3 espèces incluses dans notre étude) par un nématode du genre *Gongylonema*.
- La sensibilité à l'ivermectine connue de nématodes du genre *Metastrongylus*, proche de *Parastrongylus* [16].

I.1.4.3. Utilisation et posologies usuelles

L'ivermectine est disponible sous différentes formes :

- orale (solution ORAMEC® 0,8 mg/mL, comprimés à 3 mg STROMECTOL®, pâte EQVALAN® 18,7 mg/g)
- topique (IVOMEK POUR-ON® 5 mg/mL)
- injectable (IVOMEK® 10 mg/mL)

Les posologies varient selon l'espèce traitée et le parasite cible :

- 0,2 mg/kg per os (PO) chez les humains (*VIDAL*) et chez le cheval (*Résumé des caractéristiques du produit RCP EQVALAN® Merial*) efficace contre les parasites internes et externes incluant les poux et la gale.
- 0,2 mg/kg en sous-cutanée (SC) chez les bovins, ovins, caprins (*RCP ORAMEC® Merial, IVOMEK® Merial et IVOMEK® OVIN Merial*) contre les nématodes, la gale, les poux et les hypodermes (*glossaire*).
- Jusqu'à 0,5 mg/kg en pour-on (*glossaire*) chez le bétail pour les mêmes indications.
- 0,3 mg/kg en SC chez le porc (*RCP IVOMEK® PORCIN Merial*) contre les nématodes, les poux et la gale.
- 0,05 mg/kg par voie orale chez le chien pour le traitement de la dirofilariose (*glossaire*) et chez le chien et le chat, hors AMM, contre les nématodes.
- 0,3 à 0,4 mg/kg en pour-on chez les rongeurs et lagomorphes (*glossaire*), hors AMM, contre la gale.

I.1.5. Propriétés pharmacocinétiques

Il existe une très grande variabilité entre les espèces et les individus d'une même espèce en fonction notamment de l'âge et de l'état général [11].

→ L'absorption (*Figure 6*)

La voie d'administration (intraveineux IV, SC, IM, pour-on, PO), la forme galénique (injectable, comprimé, pâte, solution) ainsi que le solvant influencent l'absorption.

La voie SC offre une meilleure absorption et plus rapide dans un solvant aqueux que dans un mélange propylène glycol-glycérol (60/40 = IVOMECE®) [11].

L'absorption de l'ivermectine par voie orale est meilleure sous la forme d'une solution à solvant alcoolique que sous forme de comprimé [23].

D'une manière générale, les voies SC et IM retardent l'absorption de l'ivermectine par rapport à la voie orale (par rétention dans les tissus adipeux) mais offrent de meilleurs taux plasmatiques ainsi qu'une durée d'action plus longue [11].

Le pic plasmatique se retrouve environ 4 à 5 heures après ingestion orale chez l'homme (*VIDAL*).

→ La distribution [11] [23] (*Figure 6*)

On observe une bonne distribution dans tous les tissus compte tenu de son caractère lipophile (Log P = 5,83, *DrugBank*) sauf dans le cerveau car elle ne passe pas la BHE excepté chez certains chiens. Chez les races de bergers (Colley, Bobtail, Greyhound) il existe une mutation MDR1 (Multi Drug Resistance 1) de la glycoprotéine P contre-indiquant l'utilisation de l'ivermectine.

La glycoprotéine P est une protéine transmembranaire de la famille des transporteurs unidirectionnels ATP-binding cassette responsable de l'efflux de xénobiotiques (antibiotiques, immunosuppresseurs, ivermectine, lopéramide ...) des organes vers le sang. On la retrouve au niveau de l'encéphale, reins, foie, surrénales, intestins. Elle est codée par le gène MDR1.

Chez les races de chiens de berger, la mutation de ce gène entraîne la production d'une protéine non-fonctionnelle. Les xénobiotiques ne peuvent plus être éliminés du cerveau et s'y accumulent avec des taux jusqu'à 90 fois supérieurs à un individu sain. Ceci provoque une

intoxication neurologique avec des vomissements, une mydriase, ataxie, tremblements, convulsions, allant jusqu'au coma voire le décès [24].

L'ivermectine est stockée dans les tissus adipeux où l'on y retrouve donc plus fortes concentrations.

Le pic de concentration dans les squames cutanées, sébum et sueur est observé 8 à 12 heures après une administration orale.

Elle est fixée à 93% aux protéines plasmatiques (albumine et HDL).

→ Le métabolisme [23] (*Figure 6*)

On observe un métabolisme essentiellement hépatique par le cytochrome P450 3A4 en une dizaine de métabolites. Après recherche, il n'a pas été possible de trouver des références bibliographiques précisant l'activité de ces métabolites.

Une augmentation secondaire des concentrations plasmatiques 6 à 12 heures après la prise orale peut être observée suite au cycle entéro-hépatique.

La demi-vie plasmatique est très variable entre 12 et 24 heures pour l'ivermectine et jusqu'à 3 jours pour ses métabolites.

→ L'élimination [11] (*Figure 6*)

La molécule est éliminée dans les fèces en quasi totalité et seulement 2% dans les urines.

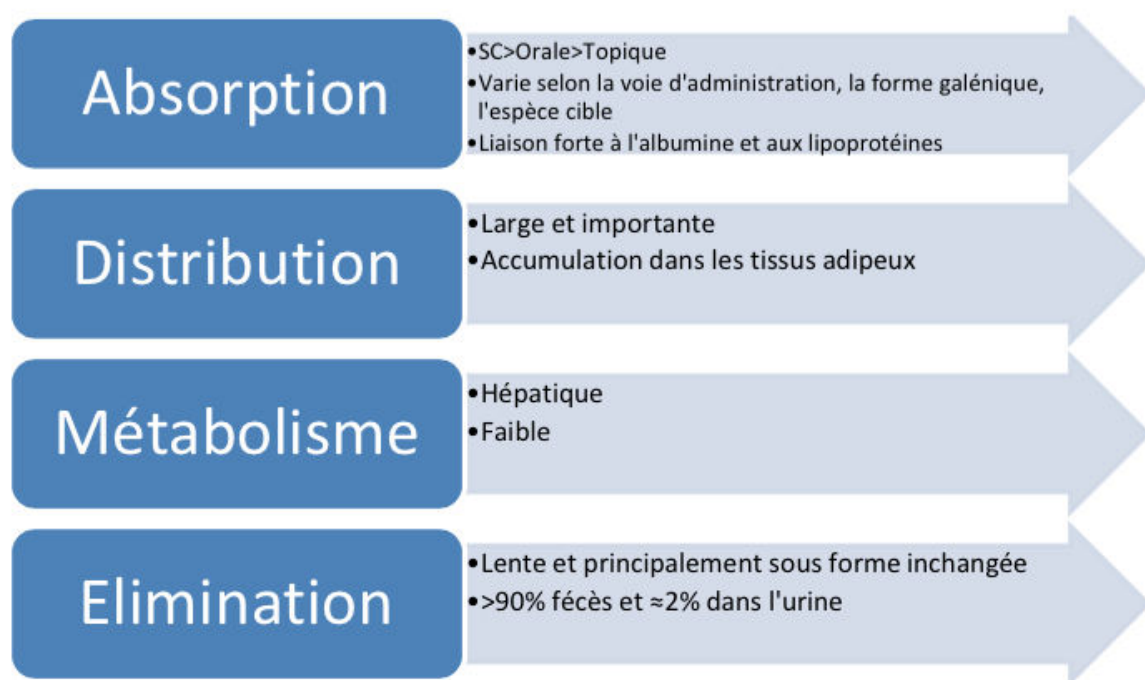


Figure 6 : Pharmacocinétique de l'ivermectine [11]

I.1.6. Toxicité

L'ivermectine possède une toxicité très faible chez l'homme jusqu'à 3 mg/kg par prise. Cependant les réactions d'hypersensibilité sont toujours possibles et imprévisibles.

Chez les mammifères, en cas de surdosage, on observe une ataxie/léthargie, une mydriase, une hypothermie avec faiblesse, des tremblements et convulsions, un coma, voire le décès. Dans de plus rares cas on retrouve une hypoventilation avec insuffisance respiratoire.

Tous ces symptômes apparaissent dans les 3 à 24 heures après l'ingestion [25].

Il n'existe pas d'antidote mais il y a possibilité d'utiliser avec précaution un inhibiteur des cholinestérases : la physostigmine afin de contrecarrer les effets délétères.

Chez l'homme, à dose thérapeutique de 200 µg/kg, peuvent apparaître des démangeaisons, nausées, céphalées, vertiges, fièvre ainsi qu'une fatigue, disparaissant après quelques jours. Exceptionnellement il peut y avoir augmentation transitoire des ASAT, ALAT et γGT.

On sait que la dose létale (DL_{50}) est de 29,5 mg/kg par voie orale chez la souris et de 10 mg/kg par voie orale chez le rat (*DrugBank*)

Une étude chez le jeune singe Rhésus (2,5 kg en moyenne) montre l'apparition d'effets indésirables en fonction de la dose administrée [25] :

- à partir de 2 mg/kg (ce qui correspond à 10 fois la dose thérapeutique chez l'homme) : vomissements.
- à partir de 12 mg/kg : mydriase.
- à partir de 24 mg/kg : sédation.

I.2. Les Callithricidés

I.2.1. Généralités [26] [27]

Les Callithricidés sont des petits primates des forêts tropicales d'Amérique Centrale et du Sud (*Figure 7*).

Il s'agit d'espèces menacées de disparition notamment par les captures et la déforestation intensives.

Ils sont concernés par de nombreux programmes de conservation et de réintroduction.

Sous embranchement										
Vertébrés	Classe									
	Mammifères	Infra classe								
		Euthériens	Ordre							
			Primates	Sous ordre						
				Haplorhiniens	Infra ordre					
					Simiens	Micro ordre				
						Platyrrhiniens	Super famille			
							Cebidae	Famille		
								Callitrichidae		

Figure 7 : Classification des Callithricidés [26] [28]

Il existe 4 genres différents (Tableau 2) :

- Le genre *Callimico* avec le *Callimico goeldii* pour seul représentant
- Le genre *Callithrix* plus communément appelés ouistitis
- Les genres *Leontopithecus* et *Saguinus* communément appelés tamarins

Tableau 2 : Tableau des différentes espèces de Callithricidés, d'après « *Mammal Species of the World* » 2005 3^e édition. Seules les espèces surlignées en bleu sont incluses dans notre protocole d'étude.

Genre <i>Callimico</i>	
<i>Callimico goeldii</i>	Tamarin de Goeldi
Genre <i>Callithrix</i>	
Sous-genre <i>Calibella</i>	
<i>Callithrix humilis</i>	Ouistiti nain à couronne noire
Sous-genre <i>Callithrix</i>	
<i>Callithrix aurita</i>	Ouistiti oreillard
<i>Callithrix flaviceps</i>	Ouistiti à tête jaune
<i>Callithrix geoffroyi</i>	Ouistiti de Geoffroy
<i>Callithrix jacchus</i>	Ouistiti commun ou à toupets blancs
<i>Callithrix kuhlii</i>	Ouistiti du Bahia
<i>Callithrix penicillata</i>	Ouistiti à pinceaux noirs
Sous-genre <i>Cebuella</i>	
<i>Callithrix pygmaea</i>	Ouistiti pygmée
Sous-genre <i>Mico</i>	
<i>Callithrix acariensis</i>	Ouistiti du Rio Acari
<i>Callithrix argentata</i>	Ouistiti argenté
<i>Callithrix chrysoleuca</i>	Ouistiti à jambes jaunes
<i>Callithrix emiliae</i>	Ouistiti de Snethlage
<i>Callithrix humeralifera</i>	Ouistiti à camail ou aux pieds jaunes
<i>Callithrix intermedia</i>	Ouistiti du Rio Aripuana
<i>Callithrix leucippe</i>	Ouistiti blanc-doré
<i>Callithrix manicorensis</i>	Ouistiti du Rio Manicoré
<i>Callithrix marcai</i>	Ouistiti du Rio Roosevelt

<i>Callithrix mauesi</i>	Ouistiti du Rio Maués
<i>Callithrix melanura</i>	Ouistiti mélanure ou à queue noire
<i>Callithrix nigriceps</i>	Ouistiti à tête noire
<i>Callithrix saterei</i>	Ouistiti des Satéré
<i>Genre Leontopithecus</i>	
<i>Leontopithecus caissara</i>	Tamarin-lion à face noire ou de Caixa
<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	Tamarin-lion à tête dorée
<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	Tamarin-lion à croupe dorée
<i>Leontopithecus rosalia</i>	Tamarin-lion doré
<i>Genre Saguinus</i>	
<i>Saguinus bicolor</i>	Tamarin bicolore
<i>Saguinus fuscicollis</i>	Tamarin à selle ou à tête brune
<i>Saguinus geoffroyi</i>	Tamarin de Geoffroy
<i>Saguinus graellsii</i>	Tamarin du Rio Napo
<i>Saguinus imperator</i>	Tamarin empereur
<i>Saguinus inustus</i>	Tamarin à face marbrée
<i>Saguinus labiatus</i>	Tamarin labié
<i>Saguinus leucopus</i>	Tamarin aux pieds blancs
<i>Saguinus martinsi</i>	Tamarin à face nue de Martin
<i>Saguinus melanoleucus</i>	Tamarin blanc
<i>Saguinus midas</i>	Tamarin aux mains rousses
<i>Saguinus mystax</i>	Tamarin à moustaches
<i>Saguinus niger</i>	Tamarin noir
<i>Saguinus nigricollis</i>	Tamarin à manteau noir
<i>Saguinus oedipus</i>	Tamarin ou Pinché à crête blanche
<i>Saguinus pileatus</i>	Tamarin à calotte rouge
<i>Saguinus tripartitus</i>	Tamarin à manteau doré

Cette liste n'est pas figée, de nouvelles espèces de Callithricidés très localisées, sont régulièrement découvertes.

Photos d'individus des 3 espèces incluses dans l'étude :



Figure 8 : Leontopithecus chrysomelas – Tamarin lion à tête dorée. Zoo de La Palmyre (photo personnelle)



Figure 9 : Leontopithecus rosalia – Tamarin lion doré. Zoo de La Palmyre (photo personnelle)



Figure 10 : Callimico goeldii – Tamarin de Gould. Zoo de La Palmyre (photo personnelle)

I.2.2. Description

→ Caractères physiques

Ce sont les plus petits primates, ils pèsent tous moins d'1 kg. Ils possèdent une longue queue non préhensile qu'ils utilisent comme balancier.

Leur nez est plat avec de larges narines.

Les pouces des mains ne sont pas opposables aux autres doigts, les ongles sont remplacés par des griffes sauf sur le gros orteil où l'ongle est plat. Le gros orteil est quant à lui opposable.

Les Callithricidés possèdent 32 dents : 2 incisives, 1 canine, 3 prémolaires, 2 molaires par hémimâchoire. Seul le genre *Callimico* possède 36 dents : 2 incisives, 1 canine, 3 prémolaires, 3 molaires par hémimâchoire. Les tamarins ont les incisives plus courtes que les canines mais elles sont de même taille pour les ouistitis [29].

→ Mode de vie

Les Callithricidés sont des primates diurnes et territoriaux vivant en groupes de 3 à 15 individus. Les ouistitis forment des groupes plus importants que les tamarins.

Ce sont des groupes familiaux puisqu'ils ne sont composés que d'un unique couple reproducteur entouré de ses 3 à 4 dernières portées. La femelle dominante inhibe le développement physiologique des autres femelles (hormones, ovulation) ainsi que leur comportement sexuel. Chez le *Callimico* et plus rarement *Callithrix jacchus* et *Leontopithecus rosalia*, la fille de la femelle dominante peut devenir reproductrice.

Chez quelques espèces de Callithricidés on peut observer des cas de polyandrie.

Tous les membres de la famille participent à l'éducation des petits. Le père ainsi que d'autres adultes portent les nouveaux nés dès la naissance. Les jeunes se tournent plus particulièrement vers leur mère pour le nourrissage [30].

La communication se fait à l'oral par des vocalises importantes (sifflements aigus, gloussements lors de la recherche de nourriture, appels longs pour alerter, gémissements lors de la rencontre entre individus) mais est aussi gestuelle par hérissément du poil [31].

Ponctuellement, des groupes d'espèces différentes peuvent se rejoindre pour des activités communes comme la recherche de nourriture.

Ils sont omnivores (fruits, fleurs, insectes, graines, nectar, sève, petits oiseaux, grenouilles, lézards, escargots ...) [32].

Leur espérance de vie est évaluée à environ 18-20 ans en captivité.

→ Reproduction

Le couple reproducteur peut donner naissance à deux petits une fois par an dans la nature et jusqu'à deux ou trois petits deux fois par an en captivité. Cependant le tamarin de Gould n'a qu'un petit par portée.

La gestation est d'environ 140 à 145 jours pour les différentes espèces de Callithricidés.

Les bébés sont autonomes (alimentation, déplacement) vers l'âge de 5 mois, atteignent la maturité sexuelle à 15 mois et leur taille adulte à 2 ans.

→ Habitat

Ces petits singes arboricoles vivent dans les parties supérieures des forêts tropicales, et ne font que de rares descentes au sol.

Les tamarins se répartissent dans les forêts sèches de l'Amazonie centrale et occidentale, en Guyane, au Panama, au nord du Brésil, au nord ouest de la Colombie et au sud est du Costa Rica. On retrouve le tamarin lion exclusivement dans le sud est du Brésil.

Le tamarin de Gould vit dans la forêt amazonienne, à l'est du Pérou, à l'ouest du Brésil, au sud de la Colombie et au nord de la Bolivie. Ces derniers ne vivent pas à plus de 5 m au dessus du sol et préfèrent les sous-bois de bambous plus denses [33].

Les ouistitis du sous-genre *Mico* vivent dans l'est et le sud de l'Amazonie, ceux du sous-genre *Callithrix* sont retrouvés sur la côte atlantique du Brésil et dans les terres intérieures.

→ Statut selon l'UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) des trois espèces entrant dans notre étude :

Tamarin lion doré, *Leontopithecus rosalia* : Espèce menacée, « en danger » (haut risque d'extinction dans la nature).

Tamarin lion à tête dorée, *Leontopithecus chrysomelas* : Espèce menacée, « en danger » (haut risque d'extinction dans la nature).

Tamarin de Gould, *Callimico goeldii* : Espèce menacée, « vulnérable » (haut risque de mise en danger).

I.2.3. Programmes de sauvegarde [34]

Le zoo de La Palmyre a été fondé en 1966 par Claude CAILLÉ.

Le parc abrite 1700 animaux représentant 115 espèces. Plus d'un quart des animaux sont des primates.

Ce sont plus de 200 naissances qui sont répertoriées chaque année au zoo.

La Palmyre joue un grand rôle dans la conservation d'espèces menacées en adhérant à près d'une vingtaine de programmes de reproduction et de conservation. La plupart concerne la sauvegarde de primates car ce sont les espèces les plus menacées dans la nature.

Le zoo de La Palmyre fait, entre autre, partie de trois programmes de conservation concernant les Callithricidés : le Lion Tamarin of Brazil Fund, le Silvery-brown Tamarin International Conservation Project et le Proyecto Titi. Ils ont notamment le but commun de sensibiliser et éduquer les populations locales à la préservation de ces espèces.

→ « Lion Tamarin of Brazil Fund » [35] :

Ce programme concerne la sauvegarde de quatre espèces de Callithricidés : le tamarin lion doré (*Leontopithecus rosalia*), le tamarin lion noir (*Leontopithecus chrysopygus*), le tamarin lion à tête dorée (*Leontopithecus chrysomelas*) et le tamarin lion à face noire (*Leontopithecus caissara*).

Concernant *Leontopithecus rosalia*, dans les années 1960, la population sauvage était estimée à moins de 200 individus, de par l'exploitation forestière intensive et l'expansion urbaine. En 1984, la fondation permet les premières réintroductions de tamarins lions dorés dans la réserve de Poço das Antas au Brésil. Le zoo de La Palmyre prend part à cette réintroduction en 1992 grâce à l'envoi d'une famille de trois tamarins lions nés au zoo. Ce sont 150 individus qui ont été réintroduits dans le parc jusqu'en 2000. Aujourd'hui la population sauvage issue des réintroductions représenterait environ 50% de la population sauvage totale et totaliserait désormais 1600 individus.

Ces réintroductions ont permis en 2003 de faire passer le tamarin lion doré de la catégorie "en danger critique" à la catégorie "en danger" sur la Liste Rouge de l'UICN.

La fragmentation et la destruction de la forêt ne permettent malheureusement plus la poursuite de ces réintroductions, seules la reforestation et la translocation de groupes représentent désormais les perspectives de survie de l'espèce.

Aujourd'hui, la fondation recueille des dons provenant de parcs animaliers hébergeant ces primates afin de financer ainsi des études sur ces singes, des recensements, des translocations, des campagnes d'éducation environnementale ou des opérations de reboisement.

→ Le Silvery-brown Tamarin International Conservation Project [35] :

Ce programme concerne la sauvegarde des tamarins à pieds blancs (*Saguinus leucopus*). Ce singe est classé « en danger » sur la Liste Rouge de l'UICN, il est en effet victime de la déforestation mais aussi du braconnage.

C'est dès sa création en 2005 que le zoo de La Palmyre adhère à cette fondation en y apportant son soutien financier. De plus, En 2006, le vétérinaire du zoo, Thierry PETIT, s'est rendu en Colombie afin d'y former des vétérinaires à la manipulation et à l'examen des Callithricidés, ainsi qu'aux maladies susceptibles de les toucher. Elle vise principalement à créer une réserve en Colombie afin de pouvoir conserver l'espèce, à développer un programme d'élevage dans les zoos colombiens, à apporter un soutien logistique et financier aux centres de sauvegarde et de réhabilitation de l'espèce en Colombie, ainsi qu'à des études de l'espèce en milieu naturel (distribution, densité, habitat disponible, structure génétique, état sanitaire).

→ Le Proyecto Titi [36]

Ce programme vise à sauvegarder le pinché à crête blanche (*Saguinus oedipus*) endémique de Colombie. Ce primate est classé « en danger critique d'extinction » sur la liste rouge de l'UICN. Tout comme le tamarin à pieds blancs il est victime de la déforestation et du braconnage. Il ne resterait actuellement plus que 6000 individus sauvages.

Ce club de conservation a été fondé en 1985, le zoo de la Palmyre en est membre depuis 2010. Cette fondation participe à la recherche sur cette espèce et soutient les campagnes d'éducation pour la protection du milieu naturel : diminution de la consommation de bois, recyclage des déchets, connaissance des pinchés...

I.3. Le parasite : *Parastrongylus dujardini*

1.3.1. Généralités [37] [38] [39]

Le *Parastrongylus dujardini* encore appelé *Angiostrongylus dujardini* est un nématode parasite des vaisseaux sanguins pulmonaires et du cœur droit, chez des rongeurs sauvages (*Figure 14*). Le ver est décrit et nommé pour la première fois en 1970 par Doby et Drozd [37]. Son étude morphologique permet de le rattacher à la famille des Angiostrongylidae.

Il s'agit d'un parasite à cycle hétéroxène (*glossaire*).

Règne								
Animalia	Infra-règne							
	Protosomia	Embranchement						
		Nematoda	Classe					
			Secernentea	Ordre				
				Strongylida	Super-famille			
					Metastrongylidea	Famille		
						Angiostrongylidae		

Figure 11 : Classification du Parastrongylus dujardini. Selon ITIS (Integrated Taxonomic Information System)

Sous sa forme adulte, le *P. dujardini* est un ver mince, filiforme, blanc, effilé aux deux extrémités. Il possède une bouche à trois lèvres entourée de papilles.

Le genre *Parastrongylus* est caractérisé par la présence de papilles à l'extrémité caudale de la femelle [1] (*Annexe 1a*) et de bourses copulatoires, chez le mâle, présentant des côtes latérales partant du tronc commun (*Annexe 1b*).

Il présente un dimorphisme sexuel, la femelle est plus grande que le mâle :

Mâle : 10 à 10,5 mm de long et 0,18 à 0,21 mm de diamètre

Femelle : 14,5 à 19 mm de long et 0,3 à 0,33 mm de diamètre

Lors de son cycle évolutif, ce *Parastrongylus* passe par plusieurs stades larvaires (1 à 4) après l'éclosion de l'œuf (*Annexe 2*).

Œufs : 0,053 à 0,086 sur 0,038 à 0,053 mm

Larve de 1er stade : 0,265 à 0,32 mm de long et 0,011 mm de diamètre

Larve de 2ème stade : peu mobile, 0,452 mm de long et 0,04 mm de diamètre

Larve de 3ème stade : en spirale et immobile, 0,488 à 0,502 mm de long et 0,31 mm de diamètre

Larve de 4ème stade :

mâle 0,930 à 0,940 mm de long et 0,04 mm de diamètre

femelle 1,00 à 1,015 mm de long et 0,04 mm de diamètre

I.3.2. Cycle évolutif de *Parastrongylus dujardini* [38] [39]

→ Hôte intermédiaire :

Jusqu'à maintenant, il n'est décrit aucun hôte intermédiaire spécifique à ce nématode.

Il s'agit de mollusques gastéropodes ayant une sensibilité plus ou moins élevée à l'infestation par ce ver. Certains poissons et vers de terre sont aussi décrits comme des hôtes intermédiaires moins fréquents [1].

Parmi ces hôtes on observe, les genres *Lymnaea* (lymnées), *Planorbis* (planorbes), *Planorbarius* (escargots), *Agriolimax* (limaces) et les espèces *Cepaea nemoralis* et *Helix aspersa* (escargots).

Les larves de stade 1 peuvent survivre dans des eaux douces ou saumâtres ou dans un sol comportant une humidité suffisante.

Elles infestent l'hôte intermédiaire en pénétrant par voie orale.

Dans le mollusque, les larves subissent une première mue donnant naissance à une larve de stade 2. Mais dans certains cas, la larve de stade 1 s'enkyste dans la paroi du tube digestif ou dans le tissu musculaire et meurt.

Environ 18 jours après l'infestation, une deuxième mue transforme les larves de stade 2 en larves de stade 3 dit « stade infestant ».

Ces larves migrent à travers les parois gastrique et intestinale puis se retrouvent dans le coelome et les fèces. La larve infestante peut survivre quelques jours dans les mêmes conditions que la larve de stade 1.

→ Hôte définitif

Le passage de l'hôte intermédiaire à l'hôte définitif n'est pas clairement décrit.

Il pourrait s'effectuer par l'ingestion d'eau contaminée par les larves infestantes, l'ingestion de nourriture contaminée par des excréments d'hôtes intermédiaires [1].

Les hôtes définitifs sauvages connus et décrits lors de la découverte du *Parastrongylus dujardini* sont le mulot *Apodemus sylvaticus* et le campagnol roussâtre *Clethrionomys glareolus*.

Le parasite peut séjourner au moins 1 an chez son hôte définitif.

L'action des sucs digestifs permettent le passage de la paroi de l'estomac et de l'intestin grêle, ainsi on retrouve, 24 heures après l'infestation, des larves dans le foie, transportées par la circulation mésentérique.

Environ 5 jours après l'infestation, les larves sont retrouvées dans les poumons, traversent la paroi alvéolaire pour rejoindre les artères pulmonaires et le cœur droit. Le passage des larves dans la sphère pulmonaire n'est pas clairement décrit et compris par les parasitologues. C'est à ce niveau que les larves mûrissent pour passer au stade 4 et donner rapidement les formes adultes.

Après maturation sexuelle, les femelles pondent dans les poumons.

Certains œufs éclosent dans le parenchyme pulmonaire pour donner les larves de stade 1, les autres partent dans les vaisseaux de faible calibre, s'y développent et éclosent. La présence de larves dans ces petits vaisseaux crée des embolies.

En passant par la voie trachéale, les larves de stade 1 se retrouvent dans les fèces 25 jours après l'infestation de l'hôte définitif.

Après excrétion, la larve au contact de l'eau s'anime et devient alors infestante pour un hôte intermédiaire.

On ne connaît à présent aucun tropisme du ver pour les tissus nerveux.

I.3.3. Données chez le singe

Pour cette partie, nous nous appuyons sur l'étude de M. Graille et al. à laquelle a participé le Dr Th. PETIT [1] pour décrire ce que l'on connaît de l'infestation par *Parastrongylus dujardini* des Callithricidés. Il s'agit avec la thèse vétérinaire de Lucie Lhuillier et un communiqué de l'EAZWV European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (communication du Dr PETIT) de l'une des rares publications disponibles sur ce sujet à ce jour. Cette étude publiée en 2015 a été conduite dans quatre parcs zoologiques français, dont le zoo de la Palmyre, à partir de 14 cas observés sur des animaux tous nés en captivité.

Dans la plupart des cas, les Callithricidés sont morts sans qu'il n'y ait eu de signes extérieurs de maladie. Seuls 3 animaux sur les 14 (21%) ont présenté une léthargie avant le décès.

Les singes ont subi une nécropsie, ce qui a permis d'identifier les lésions et confirmer la présence du ver. Le *Parastrongylus dujardini* a été retrouvé dans le ventricule droit du cœur, dans 36% des cas entraînant une cardiomégalie droite et 29% des individus ont présenté une congestion pulmonaire.

Un cas unique a présenté des nodules d'œufs et de larves dans la paroi du colon.

Tous les animaux sauf un (93%) ont présenté une pneumonie vermineuse et une artérite pulmonaire. Le parenchyme pulmonaire comportait des granulomes inflammatoires centrés sur des œufs ou des larves du parasite.

Des vers adultes ont été retrouvés dans la lumière des artères pulmonaires, souvent entourés d'un thrombus fibrineux.

La présence du ver adulte dans le ventricule droit, est associée à une myocardite.

Il est à noter que *Parastrongylus dujardini*, notamment sous forme de larves de stade 1, a été identifié chez des rongeurs capturés dans les enclos des Callithricidés puis nécropsiés, ceci a été confirmé au zoo de La Palmyre par le Dr PETIT.

Il serait important de savoir, si le singe est un nouvel hôte définitif ou un hôte accidentel car aucune larve de stade 1 n'a été retrouvée chez les Callithricidés lors de cette étude. Les Primates pourraient s'être secondairement infestés, par contact avec les rongeurs passant dans leurs cages ou bien par contact avec des hôtes intermédiaires, ou de leurs fécès. Une transmission fœtale n'est pas exclue vu le jeune âge de certains individus atteints (4 et 8 mois).

Chapitre II – Travail personnel : Matériels et méthodes

Nous avons réalisé une étude pharmacocinétique comparant différentes voies d'administration (voie intramusculaire, voie orale forcée, voie orale dans l'alimentation) d'un antiparasitaire : l'ivermectine chez les singes de la famille des Callithricidés.

Dans le cadre de ce travail et de la directive européenne 2010/63/EU sur l'expérimentation animale, nous devons déposer un dossier éthique, détaillant toutes nos manipulations et le protocole. Il s'agit d'une « demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques ». Le dossier est soumis à un comité d'éthique et l'autorisation est donnée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Le délai légal entre le dépôt du dossier et la réalisation des expériences est de 2 mois, ce délai n'était pas compatible avec l'urgence de traiter les animaux. Le vétérinaire a donc contacté l'Inspecteur en chef de la Santé Publique Vétérinaire du Poitou-Charentes, et avec l'accord de Sandryne BRUYAS (Inspecteur de la Santé Publique Vétérinaire, référent national de l'expérimentation animale), notre étude a été considérée comme « essai clinique sur des animaux hébergés à d'autres fins que des études expérimentales et atteints naturellement de la parasitose » excluant ainsi la nécessité de constituer un dossier.

II.1 Animaux utilisés

L'infestation récurrente par les vers est retrouvée chez les Callithricidés. Pour l'étude, 3 espèces sont choisies : Tamarin de Gould (*Callimico goeldii*), Tamarin lion doré (*Leontopithecus rosalia*) et Tamarin lion à tête dorée (*Leontopithecus chrysomelas*). On note dans l'article de M. Graille et al. [1] que de nombreux individus du *Callimico goeldii* ont été infestés. Il nous paraît donc intéressant d'inclure cette espèce dans l'étude.

Les animaux ont été répartis en 3 lots correspondant aux 3 modes d'administration choisis. Chaque lot est composé de 4 individus, afin d'essayer de pallier à une certaine variabilité inter-individuelle connue sur les profils pharmacocinétiques de l'ivermectine.

Vu le nombre restreint d'individus disponibles, il était difficile d'inclure plus de 12 animaux dans l'étude. Le stress induit par les injections et les prélèvements ne permettait pas d'intégrer à l'étude les groupes d'animaux reproducteurs.

L'étude comporte 5 prélèvements réalisés sur chacun des 12 animaux après administration de l'ivermectine.

Compte tenu du faible nombre d'animaux de chaque espèce détenus au zoo, nous sommes contraints d'inclure 3 espèces différentes de singes, ce choix a été déterminé par le vétérinaire en fonction des effectifs de primates dont il dispose : 4 tamarins de Gould (*C. goeldii*), 2 tamarins lions dorés (*L. rosalia*), 6 tamarins lions à tête dorée (*L. chrysomelas*).

Les 3 espèces choisies sont connues pour être très proches physiologiquement (d'après le Dr Th. PETIT). De plus, les animaux vivant dans des enclos différents, il n'est pas possible de les mélanger dans les lots. Ils sont donc répartis comme suit et aucune différence d'ordre pharmacocinétique ne sera recherchée selon l'espèce :

Lot 1 appelé voie orale « gâteau » : 4 *L. chrysomelas* recevant l'ivermectine dans leur alimentation.

Lot 2 appelé voie IM : 2 *L. chrysomelas* et 2 *L. rosalia* recevant l'ivermectine par voie IM.

Lot 3 appelé voie orale « seringue » : 4 *C. goeldii* recevant l'ivermectine par voie per os à la seringue.

De plus, l'étude est réalisée uniquement sur des individus adultes, ils ont une taille et un poids suffisants pour les prélèvements et anesthésies. Enfin, des mâles et des femelles sont inclus dans le protocole en fonction de leur stade de développement. Il n'y a pas suffisamment d'individus pour pouvoir travailler sur un même sexe.

Pendant les périodes expérimentales suivant l'administration et entre chaque prélèvement, les animaux sont remis dans le groupe social d'origine avec abris, accès à l'eau de boisson et à la nourriture.

Afin de déterminer les doses de médicaments à administrer aux singes, un protocole de pesée est mis en place la veille des administrations soit le 14 Avril 2014. En même temps, les animaux sont marqués par tonte au niveau de la queue afin de ne pas les confondre avec un singe qui

n'est pas inclus dans le protocole. Le protocole de marquage concerne les lots 1 et 3 incluant 4 animaux de la même espèce. Pour le lot 2, ce n'est pas nécessaire puisque les 2 *L. rosalia* sont seuls dans leur cage, tout comme les 2 *L. chrysomelas*. Il n'y a donc pas de confusion possible.

Le 14 avril 2014, les singes sont capturés à l'épuisette par le vétérinaire, puis identifiés par la lecture de la puce sous cutanée.

Les singes sont maintenus dans une boîte en plastique à moitié fermée afin de pouvoir être pesés. Puis le vétérinaire, en les immobilisant, coupe avec des ciseaux courbés des poils sur la queue pour le marquage. On choisit 4 positions afin de reconnaître les animaux : une tonte sur le côté droit de la queue, une tonte sur le côté gauche, une tonte sur le dessus de la partie proximale de la queue et une dernière sur sa partie distale. Après marquage les animaux sont aussitôt relâchés dans leur cage.

Grâce aux numéros d'identification des différents singes et à leur dossier individuel, nous avons reporté dans un tableau l'espèce, le sexe, le poids, le numéro d'identification et le marquage pour chaque animal (*Tableau 3*).

Tableau 3 : Tableau d'identification des individus. GHLT : Tamarin lion à tête dorée (L. chrysomelas) ; GLT : Tamarin lion doré (L. rosalia) ; TG : Tamarin de Gould (C. goeldii) ; m : mâle ; f : femelle ; id : numéro d'identification

Espèce	Sexe	poids (g)	id	marque	Lot
GHLT	M	670	5391	proximale	1
GHLT	M	713	3642	distale	
GHLT	F	742	9365	droite	
GHLT	F	657	4649	gauche	
GHLT	M	688	9305		2
GHLT	M	599	4839		
GLT	M	576	5378		
GLT	M	655	8728		
TG	F	463	9363	proximale	3
TG	M	449	1665	distale	
TG	F	461	67208	droite	
TG	M	528	50	gauche	

II.2. Médicaments et doses utilisés

- IVOMECC® injectable pour bovins, ovins, et porcs.

Utilisation de la formulation sous cutanée IVOMECC® (ivermectine) 10 mg/mL des laboratoires MERIAL par voie IM. Cette spécialité a été utilisée pour notre lot 2 en administration IM à la dose de 400 µg/kg.

- ORAMECC® solution buvable pour ruminants

Utilisation de l'ORAMECC® (ivermectine) 0,8 mg/mL des laboratoires MERIAL par voie orale. Cette spécialité a été utilisée pour l'administration de l'ivermectine dans l'alimentation (lot 1) et pour l'administration per os (lot 3) à la dose de 400 µg/kg.

- D. HYDRAT® solution pour perfusion

1 mL contient (RCP D. HYDRAT) :

Bicarbonate de sodium10 mg

Glucose anhydre30 mg

Saccharose10 mg

Caféine0,375 mg

Chlorure de sodium9 mg

Cette spécialité des laboratoires MERIAL, est utilisée pour le traitement symptomatique de la déshydratation des bovins et est administrée (2,5 mL) en SC aux singes, après chaque prélèvement sanguin, dans un but de réhydratation après de stress de la capture, de la contention et du prélèvement.

II.3. Expérimentations

Les administrations et prélèvements sanguins sur les singes sont réalisés par le Docteur Th. PETIT assisté par le Docteur G. ANFRAY. J'ai pu assister aux différentes manipulations sur les singes sans avoir pu les réaliser moi-même car ne possédant pas l'expertise requise.

Le dosage plasmatique de l'ivermectine est sous-traité au laboratoire Toxalim de l'INRA de Toulouse sous la direction du Docteur Anne LESPINE. J'ai acheminé personnellement les

prélèvements sanguins jusqu'au laboratoire à Toulouse qui m'a transmis l'ensemble de la documentation concernant cette analyse.

L'analyse pharmacocinétique des résultats a été réalisée en collaboration avec Mme le Professeur Sandrine MARCHAND de la faculté de Médecine et Pharmacie de Poitiers.

II.3.1. Préparation des doses

Pour pouvoir comparer les 3 modes d'administration nous choisissons d'utiliser l'ivermectine à la même dose de 400 µg/kg pour chaque animal quelque soit le lot. Il s'agit d'une posologie utilisée en médecine animale par le vétérinaire (communication personnelle Dr Th. PETIT).

Les solutions à administrer pour chacun des groupes sont préparées dans le laboratoire du zoo et conditionnées dans les seringues, afin de limiter le temps de présence du vétérinaire dans les cages et ainsi diminuer le stress occasionné aux singes (*Annexe 3*).

II.3.1.1. Voie orale dans un aliment appétent ou voie orale « gâteau »

Les 4 singes faisant partie de notre étude et allant recevoir l'ivermectine mélangée à un aliment appétent, vivent dans une cage contenant 8 individus. Il était impossible d'isoler les 4 individus du lot du reste du groupe. Nous devons donc adapter la prise du médicament à leur vie en groupe, c'est à dire préparer les aliments en quantité suffisante pour 8 singes.

Le poids moyen de nos 4 singes est de 700 g, par extrapolation aux autres membres du groupe, nous choisissons d'utiliser la quantité d'ivermectine correspondant à une dose de 400 µg/kg pour 8 singes de 700 g.

Ceci correspond donc à 280 µg / 0,7 kg soit 280 µg d'ivermectine par singe. Pour les 8 singes il faudra donc compter 280x8 µg, d'ivermectine, soit 2240 µg (2,24 mg).

La solution utilisée est l'ORAMEC® et a une concentration de 0,8 mg/mL d'ivermectine. Il nous faudra utiliser un volume de 2,8 mL pour le groupe, à répartir dans les aliments.

L'ORAMEC® est mélangé à de l'eau et à une poudre alimentaire afin de constituer une sorte de gâteau. Après avoir durci, il est fractionné en plusieurs morceaux disposés dans une soucoupe en plastique (*Annexe 4*).

II.3.1.2 Voie intramusculaire

Pour chaque singe il est calculé le volume exact d'IVOMEK® à injecter pour correspondre à la dose de 400 µg/kg.

Les individus de ce groupe pèsent entre 576 et 688 g, sachant que la concentration en ivermectine de l'IVOMEK® est de 10 mg/mL, les volumes à injecter seront de 0,023 à 0,027 mL.

Si nous étions restés sur la dose habituelle de 200 µg/kg utilisée chez l'homme, les volumes auraient été trop faibles pour être mesurés avec précision. En effet, les seringues à insuline utilisées ont un volume de 0,3 mL au total et sont graduées à 0,005 mL, il y aurait eu trop d'imprécision en travaillant avec des volumes compris entre 0,0115 et 0,0135 mL. Cette difficulté conforte le choix du vétérinaire d'une posologie à 400 µg/kg.

II.3.1.3. Voie orale forcée à la seringue

Les individus de ce lot pèsent entre 449 et 528 g, sachant que l'ORAMEC® a une concentration en ivermectine de 0,8 mg/mL, les volumes administrés pour une dose de 400 µg/kg sont de 0,22 à 0,26 mL.

II.3.2. Administrations

L'administration d'ivermectine peut se faire par voie injectable ou orale.

Nous cherchons à savoir quelle voie sera la plus adaptée pour atteindre des concentrations plasmatiques suffisantes tout en ayant une toxicité la plus faible possible.

La molécule est donc administrée à 4 singes différents par lot, selon les 3 modes d'administration précédemment décrits.

Les administrations s'effectuent le lendemain de la pesée des animaux, le mardi 15 Avril 2014.

II.3.2.1. Voie orale dans un aliment appétent ou voie orale « gâteau »

La soucoupe comportant une quinzaine de fragments du gâteau est déposée par le soigneur au milieu de la cage des tamarins lion à tête dorée à 8h10.

Au bout d'une demi heure les animaux ne s'intéressent plus à l'aliment, la soucoupe est retirée.

Avec ce qu'il reste, on estime que 80% du gâteau ont été consommés.

II.3.2.2 Voie intramusculaire

L'animal est capturé au filet dans sa cage par le vétérinaire.

L'individu est identifié par sa puce, ce qui permet de lui attribuer la seringue contenant le volume d'ivermectine correspondant à son poids.

Après contention manuelle contre la grille de la cage d'une main et maintien de la jambe tendue du singe, un autre vétérinaire administre lentement, au travers du grillage le contenu de la seringue dans le muscle de la cuisse. Puis l'animal est relâché dans la cage.

L'administration en IM pour ces 4 singes s'effectue à 08h00.

II.3.2.3 Voie orale forcée à la seringue

L'animal est capturé au filet dans sa cage par le vétérinaire.

L'individu est identifié par sa puce, ce qui permet de lui attribuer la seringue contenant le volume d'ivermectine correspondant à son poids.

Après contention manuelle contre la grille de la cage d'une main et maintien de la tête de l'animal pour que la bouche soit accessible, un autre vétérinaire administre lentement à la seringue le produit dans la bouche en veillant à ce que la totalité du contenu soit absorbée par l'animal (*Annexe 5*). Puis l'animal est relâché dans la cage.

L'administration orale pour ces 4 singes s'effectue à 08h45.

II.3.3. Prélèvements

Les prélèvements sont effectués du 15 au 18 avril 2014.

II.3.3.1. Établissement du protocole

Afin de décrire le profil pharmacocinétique, il convient de réaliser les prélèvements sur une durée minimale équivalente à 5 demi-vies du médicament. Nous avons établi le protocole avec l'aide du Dr Th. PETIT, du Pr. S. MARCHAND et du Dr. A. LESPINE qui étudie les lactones macrocycliques.

Les données de la littérature montrent une demi-vie d'environ 12h chez l'homme (RCP STROMEKTOL®). Chez l'homme, le cheval [40] [41] et le chien [11] [42] le t_{max} se situe autour de 4h.

Pour respecter la durée minimale équivalente à 5 demi-vies, nous décidons d'étaler nos prélèvements sur 72h.

Les 5 temps de prélèvement sont choisis selon le profil pharmacocinétique de la molécule :

- 3 temps précoces à 4, 10 et 24 heures après l'administration.
- 2 temps plus tardifs à 48 et 72 heures après l'administration.

Les singes n'ayant pas été traités dans les 3 semaines précédant l'étude, aucun prélèvement n'a été réalisé à juste avant l'administration ($t = 0h$), la concentration plasmatique a été considérée comme nulle.

II.3.3.2 Anesthésies

Les procédures de prélèvement se font sous anesthésie générale gazeuse. Ceci nécessite le port de gants, la capture de l'animal au filet, une contention manuelle et enfin la pose du masque d'anesthésie (*Annexe 6*).

On utilise l'isoflurane à 5% sur une très courte durée pour anesthésier l'animal, la concentration est diminuée à 3% pour le maintien de la sédation au moment de la prise de sang au niveau de la veine fémorale.

La durée maximale des anesthésies ne dépassait pas 5 minutes (*Annexe 7*).

II.3.3.3. Volumes prélevés

Selon l'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires suisse (OVF), un volume de sang prélevé sur une durée de 14 jours, s'il est inférieur à 20% de la masse sanguine totale, n'a pas d'effet néfaste pour les animaux [43].

Les singes pèsent de 500 à 650 g, leur volume sanguin est estimé à 7% de la masse corporelle, soit un minimum de 31,4 mL. On pourrait donc prélever au maximum 6,3 mL de sang sans que cela ne nuise aux animaux.

Les dosages nécessitent un volume de plasma de 200 μ L. Afin d'obtenir une analyse pharmacocinétique juste et représentative, les dosages sont faits deux fois.

Cela nécessite donc 400 μ L de plasma. L'hématocrite du singe étant d'environ 50%, il faudra donc 800 μ L de sang. Pour plus de sécurité lors des manipulations, il sera prélevé un peu plus soit 1 mL par singe.

Chaque primate subissant 5 prélèvements dans les 72 heures, il sera prélevé au total 5 mL, soit un volume inférieur aux préconisations de l'OVF.

II.3.3.4. Déroulement des prélèvements

Les prélèvements se déroulent en présence de 2 vétérinaires et moi-même, selon le protocole suivant :

- Port de gants, capture de l'animal par le vétérinaire au filet dans sa cage et contention manuelle dans le filet.
 - Allumage du concentrateur à oxygène, réglage de l'appareil pour anesthésier les singes sur le débit de 5% d'isoflurane.
 - Lecture de la puce pour l'identification de l'animal.
 - Pose du masque et contention manuelle de l'animal.
 - Dès que le singe est complètement atone, on règle la concentration de l'isoflurane à 3%
 - Désinfection avec de l'alcool modifié de l'intérieur de la cuisse. Repérage au toucher de l'emplacement de la veine.
 - Ponction sanguine à la seringue puis introduction du prélèvement dans un tube hépariné (tube héparinate de sodium 4 mL réf.367884, BD Vacutainer, Beckton Dickinson) aussitôt homogénéisé par plusieurs retournements (*Annexe 8*).
 - Pour chaque prélèvement sont consignés dans un tableau : le numéro d'identification du singe, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le numéro du tube.
 - Dès le retrait de l'aiguille, le point de ponction est comprimé manuellement avec une compresse afin d'éviter tout hématome.
 - Injection en SC 2,5 mL de D.HYDRAT®. -
- lorsque le point de ponction ne saigne plus, l'anesthésie est stoppée, le singe est placé dans une cage de transport fermée. Quelques minutes après il retrouve toute son activité et est libéré dans la cage avec son groupe.

II.3.3.5. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est effectuée selon le protocole suivant :

Les tubes sont centrifugés, le plasma est décanté par pipetage (micropipette) et réparti en deux fractions aliquotes égales, d'environ 250 μ L, dans des tubes Eppendorf numérotés de 1,5 mL.

Les prélèvements sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à la réalisation du dosage.

II.4 Analyse HPLC [44] [45]

Le mercredi 28 mai 2014, les prélèvements sont déposés au laboratoire TOXALIM de l'INRA de Toulouse, les tubes congelés ont été conditionnés dans des glacières isolantes avec des accumulateurs de froid et transportés par véhicule personnel entre le zoo de La Palmyre et le laboratoire de Toulouse.

II.4.1 Principe de la méthode

Le dosage est effectué par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inversée, c'est à dire que la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile polaire. Plusieurs étapes sont nécessaires :

- Extraction du principe actif (ivermectine) à partir de l'échantillon biologique (plasma).
 - Dérivatisation de l'ivermectine en un composé fluorescent qui permet une meilleure détection en fluorimétrie qu'une détection, sans dérivation, dans l'ultra-violet.
- La dérivation est une technique qui permet d'analyser un composé qui ne peut être directement analysé en HPLC, en synthétisant un sous-produit de ce composé présentant des propriétés facilitant son analyse par chromatographie.

- L'échantillon à analyser est injecté puis transporté par la phase mobile polaire au travers de la colonne chromatographique contenant la phase stationnaire apolaire. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire.

Le temps de rétention est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire. Ce temps est caractéristique d'une molécule dans des conditions d'analyse donnée.

- Détection et quantification du composé fluorescent (ivermectine dérivatisée), par spectrophotométrie fluorimétrique.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié, la molécule est caractérisée par un pic dont la surface est proportionnelle à sa quantité.

- Validation de la méthode.

II.4.2. Consignes de sécurité et gestion des déchets

On utilise des gants à usage unique lors de la manipulation des échantillons et des solvants.

La préparation des échantillons, des solvants d'élution pour l'HPLC, la préparation et l'utilisation des réactifs de dérivation, se font sous hotte aspirante.

L'élimination des solvants et des solutions se fait dans des containers qui seront ensuite traités par une société extérieure.

II.4.3. Réception, stockage et distribution des échantillons

Après réception au laboratoire, les échantillons sont enregistrés sur un formulaire mentionnant:

- La date.
- Le nom de l'équipe technique.
- Le nom de l'expérimentateur.
- Le nom/numéro de l'expérimentation.
- La nature de l'échantillon.
- Le lieu de stockage (n° de pièce).
- N° de tiroir/ n° de compartiment.

Les échantillons étiquetés sont stockés à -20°C avant analyse.

II.4.4. Protocole d'analyse

II.4.4.1. Extraction de l'ivermectine

- Décongélation des échantillons à température ambiante.
- Homogénéisation des échantillons par passage au vortex (5 secondes).
- Prélèvement de 0,2 mL d'échantillon (vérifier l'absence de fibrine en suspension).
- Transfert des 0,2 mL dans un tube Eppendorf de 2 mL.

- Ajouter 1mL d'acétonitrile (ACN) froid (stocké à -20°C) passage au vortex 5 secondes.
- Homogénéisation par agitation automatique pendant 20 minutes, passage au vortex 5 secondes.
- Centrifugation des échantillons 5 minutes à 13500 tours/minute à 6°C.
- Transfert du surnageant dans un tube pyrex (16x100 mm).
- Concentration du surnageant par évaporation à sec sous flux continu d'azote à l'aide de l'appareil Turbovap®Biotage (60°C pendant 14 minutes) puis refroidissement de l'échantillon à température ambiante.

II.4.4.2. Préparation des solutions de dérivation

Solution A : N-methylimidazole/ACN (1/1, v/v) utiliser la seringue de précision 1 mL : dans le tube en verre déposer 1 mL d'ACN, 2 mL de methylimidazole et 1 mL d'ACN.

Solution B : Anhydride trifluoroacétique/ACN (1/2, v/v) utiliser la seringue de précision 1 mL dans un tube en verre, déposer 2 mL d'ACN, 2 mL d'anhydride trifluoroacétique, 2 mL d'ACN.

II.4.4.3. Dérivation

Ajouter 100 µL de la solution A dans le tube contenant l'extrait sec d'ivermectine (déposer contre la paroi du tube), agiter au vortex 3 secondes puis ajouter 150 µL de la solution B (déposer au centre du tube), agiter au vortex 3 secondes.

Une fumée blanche apparaît et se dissipe.

Transvaser l'échantillon dans un micro tube adapté pour injecteur HPLC et mettre une capsule sur le tube d'injection avec la pince adaptée (si injecteur 460) ou dans un flacon de couleur ambrée avec bouchon à vis et septum téflon (si injecteur 360).

II.4.5. Les réactifs HPLC

Préparation de phases mobiles pour HPLC :

Il s'agit de préparer les solvants et les solutions qui constituent la phase mobile de l'HPLC qui servent à détecter et à doser les lactones macrocycliques, selon les méthodes du laboratoire de Toulouse [44].

→ Préparation de l'acide acétique à 0,2%, volume total 1000 ml

- Remplir une éprouvette à bouchon rodé (1000 mL) jusqu'à la graduation 600 mL avec de l'eau ultrapure.
- Ajouter 2 mL d'acide acétique glacial 100%. Compléter à 1000 mL (qsp) avec de l'eau ultrapure.

→ Préparation du solvant pour le dosage de l'ivermectine

La phase polaire mobile (éluant) est composée de 40,2%/58%/1,8% (v/v/v) de méthanol/d'acétonitrile/d'acide acétique 0,2%.

- Verser 9 mL d'acide acétique à 0,2% dans une éprouvette (25 mL).
- Verser 100 mL de méthanol dans une éprouvette (250 mL) puis ajouter les 9 mL d'acide acétique 0,2%.
- Ajuster le volume total à 210 mL avec du méthanol.
- Bien homogénéiser le mélange (transvaser plusieurs fois dans une autre éprouvette de 250 mL).
- Verser 160 mL d'acétonitrile dans une éprouvette de 500 mL puis ajouter le mélange méthanol-acide acétique 0,2%.
- Compléter jusqu'à 500 mL avec l'acétonitrile, bien homogénéiser ce mélange.

→ Filtration et dégazage du solvant

- Placer le support porte filtre, garni d'un filtre en nylon de diamètre 47 mm et de porosité 0,45 μm , sur un erlenmeyer avec le col rodé.
- Placer le réservoir puis mettre la pince
- Verser simultanément le solvant en ouvrant le robinet de la trompe à vide (au maximum) ce qui permet le dégazage et la filtration du solvant.

La filtration permet de retenir les particules contenues dans le solvant et éviter qu'elles ne passent dans la chaîne HPLC.

Le dégazage est nécessaire afin d'éviter que la présence d'une bulle d'air ne fasse varier le débit de la pompe.

II.4.6. Le système HPLC

- Réservoir de phase mobile : Un réservoir de solvant polaire (ou éluant) qui contient la phase mobile en quantité suffisante, jusqu'à 2 L. (*Figure 12*)
- Pompe : permet d'assurer un débit constant de 1,5 mL/min. Modèle Kontron 420 ou Kontron 525.
- Injecteur : L'injecteur comporte une vanne à boucles d'échantillonnage automatique. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant et ainsi de ne pas modifier la pression dans la colonne, ce qui est important pour l'analyse quantitative. Injecteur à boucles d'échantillonnage automatique Kontron modèle 360 ou 460 avec un volume de la boucle d'injection de 100 μL .
- Colonne : La phase inverse stationnaire est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette phase est apolaire et nécessite donc l'utilisation d'un éluant polaire.

Colonne utilisée SUPELCOSIL™ C-18 HPLC : longueur 250 mm, diamètre 4,6 mm, granulométrie du gel 5 μm .

-Détecteur fluorimétrique : La détection de fluorescence a été effectuée à des longueurs d'ondes de 355 nm en excitation et 465 nm en émission. Cette détection est très sensible et très sélective.

Le détecteur utilisé est de type Jasco FP-920 ou FP 2020.

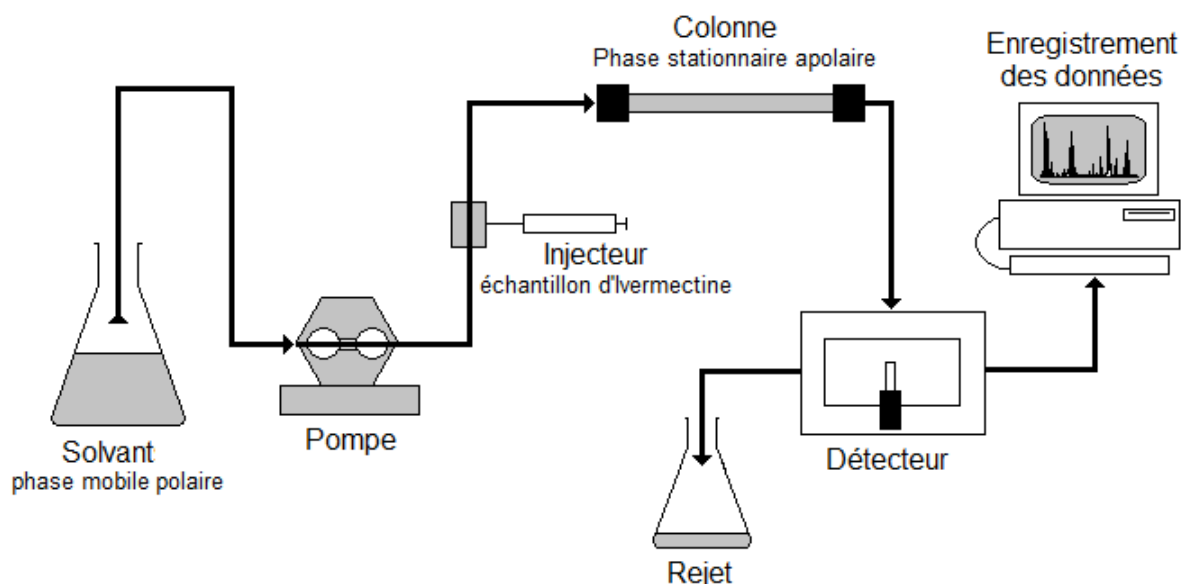


Figure 12 : Schéma de principe d'une chaîne d'HPLC

II.4.7. Validation de la méthode

Le but de la validation d'une méthode d'analyse est de démontrer qu'elle correspond à l'usage pour lequel elle est prévue et de prouver que le protocole est suffisamment exact et fiable pour avoir confiance dans les résultats fournis.

Les principaux paramètres à déterminer sont les suivants :

- Coefficient d'extraction : quantité de plasma sanguin dont est extraite la substance : 95%.
- Répétabilité : La répétabilité détermine l'écart maximum au niveau de confiance : 95% entre 2 résultats obtenus sur un même échantillon pour une même méthode, un même analyste, un même appareil, à un même temps.

Dans notre étude la répétabilité du dosage est de l'ordre de 2% pour les concentrations supérieures à 2 ng/mL et de 8% pour les concentrations inférieures.

- Limite de détection : plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Dans notre étude la limite de détection de l'ivermectine est de 0,008 ng/mL.

- Limite de quantification : plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Dans notre étude la limite de quantification de l'ivermectine est de 0,075 ng/mL.

Pour un maximum de précision et de reproductibilité, tous les prélèvements sont effectués avec des micropipettes étalonnées régulièrement et après formation du manipulateur au pipetage de précision.

Chaque échantillon est analysé deux fois, un coefficient de corrélation entre les deux valeurs obtenues est ensuite calculé afin de garantir la validité de la méthode.

II.5. Analyse pharmacocinétique

Les paramètres pharmacocinétiques sont déterminés pour chaque singe par une analyse pharmacocinétique non-compartmentale. Les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés à l'aide du logiciel WinNonLin 6.2.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, Calif.).

La demi-vie ($t_{1/2}$), permet de quantifier la rémanence d'un xénobiotique dans l'organisme et estimée par le calcul de la pente de la phase finale d'élimination.

L'AUC_{inf} est la surface sous la courbe de l'évolution des concentrations plasmatiques en fonction du temps. Elle correspond à l'exposition de l'organisme à un médicament, donc plus l'AUC est élevée, plus on peut considérer que le médicament a bien pénétré dans l'organisme. La surface sous courbe de 0 à 72h est calculée en utilisant la méthode des trapèzes linéaires.

L'extrapolation entre 72h et l'infini est estimée par le rapport de la concentration terminale sur la constante de vitesse d'élimination (k_e estimée par la pente).

La demi-vie est calculée comme étant le rapport de $\ln 2$ / k_e .

Le $t_{\max}$ correspond au temps de prélèvement où la concentration plasmatique est la plus élevée.

Le $C_{\max}$ correspond à la plus forte concentration plasmatique.

Chapitre III – Résultats et discussion

L'évolution des concentrations plasmatiques d'ivermectine en fonction du temps après administrations orale à la seringue, orale dans un gâteau et intramusculaire sont présentées dans la *figure 13* et les *tableaux 4* et *5*.

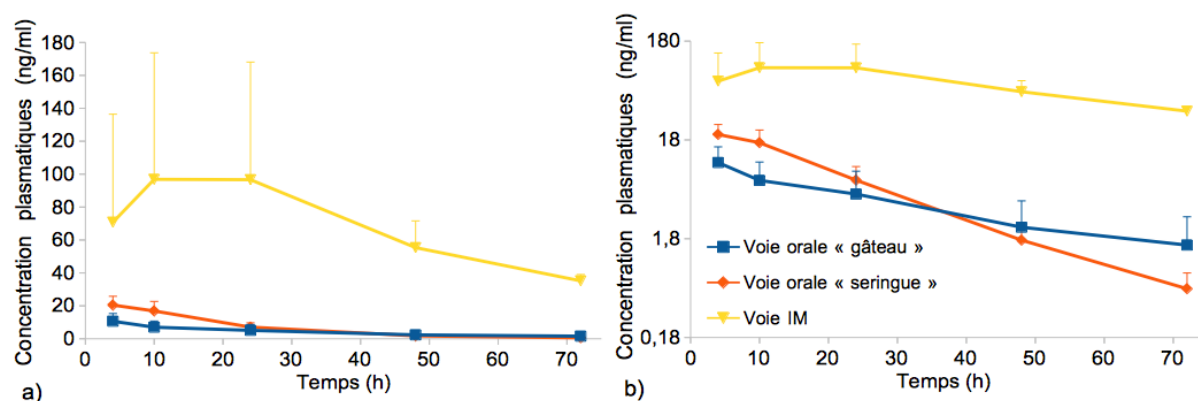


Figure 13 : Evolution des concentrations plasmatiques d'ivermectine en fonction du temps après administrations orale dans un gâteau (■), orale à la seringue (◆) et intramusculaire (▼) à la dose de 400 µg/kg. a) en coordonnées décimales. b) en coordonnées semi-logarithmiques

L'absorption semble plus lente après administration IM qu'après administration per os, en effet, la concentration maximale après administration IM (*Figure 13* et *Tableau 4*) est obtenue à un $t_{\max}$ de 10h alors que pour les deux voies orales, elle est obtenue plus tôt, dès le premier temps de prélèvement à $t=4h$ (*Figure 13* et *Tableau 4*). De plus, la concentration maximale moyenne ($C_{\max}$) obtenue après IM ($96,9 \pm 76,9$ ng/mL) est environ 5 à 10 fois plus forte que la $C_{\max}$ après les deux voies orales. On peut noter toutefois une différence par un facteur 2 entre les concentrations maximales observées lors des deux voies d'administration orale (administration avec un gâteau ou par la seringue).

Or, lors de l'expérimentation, il a été constaté que l'ensemble du gâteau n'a pas été mangé par les singes. Toute la dose n'a donc pas été consommée. De plus, on ne sait pas si tous les singes ont consommé du gâteau et en quelles proportions. La dose ingérée n'est donc pas contrôlée pour cette voie orale à l'origine certainement du $C_{\max}$ plus bas pour cette voie d'administration (*Tableau 5*).

Tableau 4 : Valeurs moyennes des concentrations plasmatiques en ivermectine pour chaque voie d'administration

Concentrations (ng/mL)	Temps (h)				
	4	10	24	48	72
Voie orale « gâteau »	10,6±4,7	7,0±3,8	5,1±3,6	2,4±2,0	1,6±1,5
Voie IM	70,8±65,6	96,9±76,9	96,6±71,5	55,4±16,3	35,2±3,9
Voie orale « seringue »	20,4±5,4	16,9±5,8	7,1±2,6	1,7±0,8	0,6±0,3

Tableau 5 : Valeurs des différents paramètres pharmacocinétiques étudiés, pour chaque voie

Voie orale « gâteau »	Espèce	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{inf} (h.ng/mL)
Singe « 3642 »	GHLT	5,4	4	22,2	157
Singe « 4649 »	GHLT	11,8	4	23,3	339
Singe « 5391 »	GHLT	8,8	4	22,3	199
Singe « 9365 »	GHLT	16,5	4	34,4	749
Moyenne ± SD		10,6 ± 4,7	4	25,6 ± 6	361 ± 270

Voie IM	Espèce	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{inf} (h.ng/mL)
Singe « 4839 »	GHLT	38,2	48	245,8	14870
Singe « 5378 »	GLT	193,4	10	18,3	9103
Singe « 8728 »	GLT	121,9	10	27,1	7342
Singe « 9305 »	GHLT	50,2	10	139,1	11064
Moyenne ± SD		100,9 ± 71,9	19,5 ± 19	107,6 ± 107,3	10595 ± 3230

Voie orale « seringue »	Espèce	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (h)	t _{1/2} (h)	AUC _{inf} (h.ng/mL)
Singe « 50 »	TG	13,8	4	13,2	272
Singe « 1665 »	TG	23,9	4	11,6	474
Singe « 9363 »	TG	18,5	4	12,3	453
Singe « 67208 »	TG	25,5	4	13,2	655
Moyenne ± SD		20,4 ± 5,3	4	12,6 ± 0,8	464 ± 157

La demi-vie moyenne de la voie IM (107,6 ± 107,3h *Tableau 5*) est plus élevée que pour les deux voies orales (25,6 ± 6h pour la voie orale « gâteau » et 12,6 ± 0,8h pour la voie orale « seringue »), ce qui pourrait s'expliquer par une absorption IM plus lente qu'après

administration orale et qui limiterait l'élimination de la molécule, traduisant un phénomène de flip-flop. On peut également noter que la demi-vie moyenne de la voie orale « gâteau » est plus longue (dans une moindre mesure) que celle de la voie orale « seringue » suggérant que l'alimentation ralentit l'absorption de l'ivermectine (même si cela n'apparaît pas au niveau du $t_{\max}$ lié à un prélèvement unique réalisé à 4h). Ceci impacte ainsi la demi-vie et génère là aussi un phénomène de flip-flop laissant penser que la demi-vie observée lors de l'administration avec le gâteau n'est qu'une demi-vie apparente.

Les ratios d'AUC peuvent être comparés pour évaluer les différences d'exposition à l'ivermectine entre les différentes voies d'administration. Il existe un facteur 23 entre les AUC_{inf} de la voie IM et de la voie orale « seringue » (*Tableau 5*). C'est la voie IM qui offre une plus grande exposition à l'ivermectine.

Les AUC_{inf} pour les deux voies orales sont du même ordre de grandeur avec un rapport $AUC_{\text{inf}} \text{ orale «seringue»} / AUC_{\text{inf}} \text{ orale «gâteau»}$ égal à 1,3 (*Tableau 5*). Cette différence d'exposition à l'ivermectine entre la voie IM et les voies orales peut s'expliquer par le fait que l'ivermectine est connue pour être un substrat de la glycoprotéine P (*DrugBank*). Il s'agit d'une protéine d'efflux que l'on retrouve entre autre à la surface des cellules épithéliales de l'intestin au niveau du pôle apical (lumière de l'intestin). L'ivermectine lors d'une administration PO est donc prise en charge par la glycoprotéine P, redirigée dans la lumière intestinale, limitant ainsi sa biodisponibilité orale.

Concernant la voie IM, on constate une grande variabilité. En effet deux sous-groupes semblent apparaître correspondant chacun à une espèce de singe différente (*L. chrysomelas* et *L. rosalia*). Les *L.chrysomelas* présentent un $C_{\max}$ moyen de 44,2 ng/mL, soit 4 fois plus faible que celui observé pour les *L.rosalia* (157,7 ng/mL *Tableau 5*). On constate une demi-vie 8 fois plus longue pour les *L.chrysomelas* (192,5h *Tableau 5*) que pour les *L.rosalia* (22,7h *Tableau 5*). Cette variabilité se retrouve également au niveau des AUC_{inf} avec une moyenne de 12967 h.ng/mL pour les *L.chrysomelas* et 8223 h.ng/mL pour les *L.rosalia*. La surface sous courbe étant définie par le rapport $F \cdot \text{Dose} / CL$, où F correspond à la biodisponibilité et CL à la clairance de la molécule. La dose administrée étant identique pour les deux espèces, ainsi que la biodisponibilité, une différence d'élimination (clairance) entre les deux espèces semble donc être à l'origine de cette modification d' AUC_{inf} .

Cependant, cette différence d'élimination ne semble pas expliquer à elle seule la variabilité entre les demi-vies chez les deux espèces. La demi-vie ($t_{1/2} = \ln 2 \cdot V_d / CL$) dépendant à la fois de la clairance de la molécule mais aussi de son volume de distribution V_d . La différence entre les demi-vies pourrait être attribuée à des différences de distribution entre les deux espèces, bien qu'elles soient considérées comme proches physiologiquement (selon le Dr Th. PETIT). Bien sur, le faible nombre d'animaux ne nous permet pas de conclure de manière formelle et il conviendrait de confirmer ces données par une étude plus approfondie.

Concernant l'estimation des surfaces sous la courbe par la méthode non-compartmentale, il convient en pratique pharmacocinétique classique d'obtenir un pourcentage d'aire sous la courbe extrapolée inférieure à 20%, en pharmacocinétique cela est généralement réalisable sur 3,3 demi-vies. Pour les deux voies orales, les pourcentages d'extrapolation sont inférieurs à 25%, ce qui est tout à fait acceptable (*Annexe 9*). Pour la voie intramusculaire on observe des pourcentages entre 70 et 85% pour le sous-groupe des deux *L. chrysomelas*, avec une demi-vie d'élimination moyenne estimée à 192,5h il aurait donc fallu continuer les prélèvements bien après les 72 heures afin d'avoir une meilleure estimation des demi-vies et des AUC. Pour les deux *L. rosalia*, les pourcentages d'extrapolation sont acceptables, étant inférieurs à 20% (*Figure 14*).

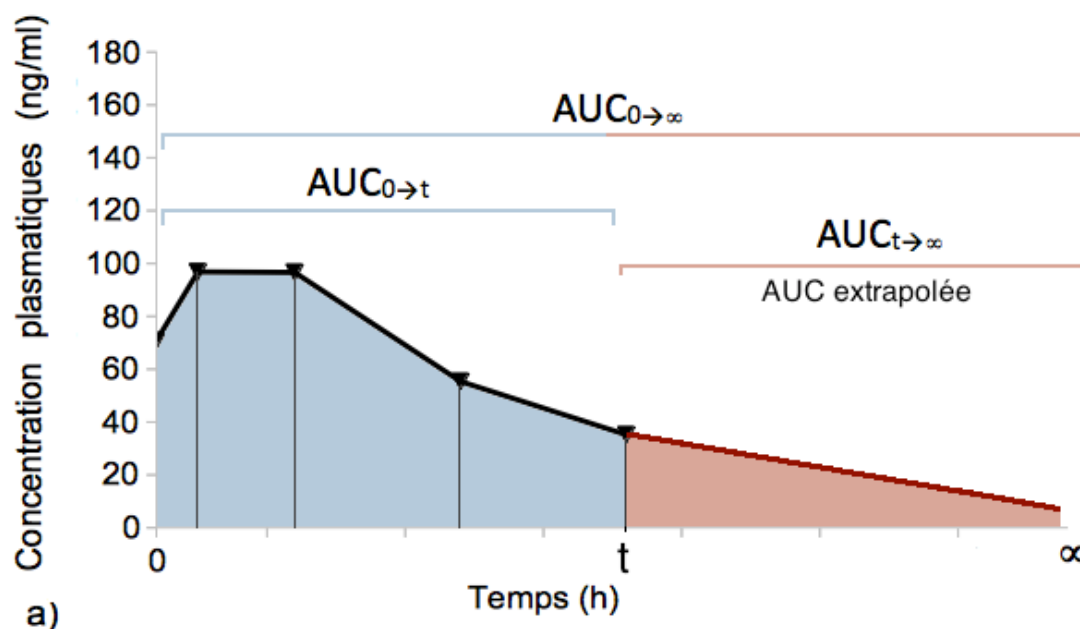


Figure 14 : Extrapolation des AUC

Les données concernant l'utilisation ou la pharmacocinétique de l'ivermectine chez les singes sont inexistantes dans la littérature scientifique. Il n'existe notamment officiellement aucune donnée sur l'efficacité de l'ivermectine. On ne dispose pas d'équivalent à la concentration minimale inhibitrice (CMI) comme pour les antibiotiques ou de biomarqueur d'efficacité. On ne peut donc rien conclure quant à l'efficacité de nos concentrations plasmatiques sur le *Parastrongylus dujardini*.

Cependant selon Gonzalez Canga A. et al. [11] une concentration plasmatique de 0,5 à 1 ng/mL est nécessaire pour obtenir une activité anthelmintique optimale contre les nématodes intestinaux et pulmonaires chez le bétail. Dans le cas de notre étude, les concentrations plasmatiques sont au dessus de ces valeurs sur toute la durée de l'étude (72h pour les voies IM et orale « seringue » mais uniquement jusqu'à 48h pour la voie orale « gâteau »), nous pouvons supposer avec beaucoup de précautions que nos administrations d'ivermectine chez tous les singes étaient efficaces pour lutter contre des infestations de nématodes pulmonaires et/ou gastro-intestinaux.

Une étude de Gokbulut C. [2] chez la chèvre montre qu'après une administration orale d'ivermectine sous forme de comprimé on observe un C_{max} de $10,33 \pm 4,10$ ng/mL et un $t_{1/2}$ de 16 heures. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles que nous avons obtenues après administration orale dans notre étude, ce qui semble confirmer nos résultats.

Il convient donc de se demander si la concentration plasmatique la plus élevée serait la plus efficace, si une demi-vie plus longue offrant une meilleure couverture par l'ivermectine serait plus utile dans le traitement et dans la prévention des infestations, auxquels cas nous choisirions la voie intramusculaire.

La voie orale « gâteau » ne semble pas convenir au traitement d'un groupe. La dose administrée n'est pas contrôlée et il existe le risque qu'elle soit nulle.

Il n'est pas à exclure une certaine résistance du parasite à l'ivermectine. Nous ne sommes pas en mesure de l'estimer, mais cela renforce l'intérêt de travailler dans des concentrations estimées efficaces, tout comme pour les antibiotiques. En travaillant avec des concentrations en ivermectine sub-thérapeutiques nous risquerions de sélectionner des résistants.

La voie IM est également connue pour avoir une absorption erratique, il aurait certainement été préférable d'utiliser la voie SC sachant que l'administration SC est souvent considérée comme

ayant une biodisponibilité proche de 100%. Le choix de la voie IM a été fait en raison de sa plus grande facilité de mise en œuvre sur des animaux de petite taille.

Notre étude présente un certain nombre de faiblesse, notamment sur le fait d'inclure différentes espèces dans les groupes et donc d'avoir des groupes hétérogènes. De plus, ce ne sont pas les mêmes individus utilisés pour l'ensemble des trois voies d'administration, ni au sein de chaque voie (la voie IM comptant deux espèces), aussi ont été inclus des individus d'âge et de sexe différents en faible nombre et chaque animal n'est pas son propre contrôle. Cependant il s'agit d'effectifs représentatifs d'une population de zoo et le choix des animaux est limité. Il est important de noter qu'aucun effet indésirable ou secondaire n'a été noté par le vétérinaire dans les jours suivant l'administration de l'ivermectine.

CONCLUSION

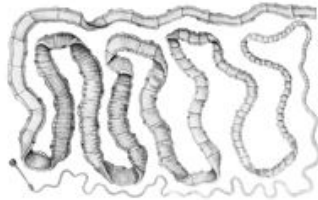
Cette nouvelle forme d'infestation par *Parastrongylus dujardini* représente un risque important pour les Callithricidés en captivité. Notre étude tend à montrer que la recherche de la meilleure voie d'administration de l'ivermectine pour prévenir et ou soigner cette parasitose, est la voie IM.

Cependant, dans le cas précis du zoo de La Palmyre, malgré un traitement préventif par l'ivermectine, la mortalité des singes callithricidés n'a pas diminuée depuis la réalisation de ce travail (selon le Dr Th. PETIT- communication personnelle, mai 2016), ce qui a conduit à abandonner ce traitement, dans l'état actuel des connaissances.

Notre étude a été réalisée sur un petit nombre d'animaux et sans contrôle de l'efficacité parasitologique du traitement. Elle diffère des autres publications retrouvées dans la littérature par le fait qu'elle donne une notion globale de l'évolution des concentrations plasmatiques en ivermectine et des AUC chez les espèces de singe étudiées, et pas uniquement un rapport de concentrations. Ce travail pourrait être approfondi, en y couplant une analyse pharmacodynamique, en comparant les profils pharmacocinétiques après administration de doses différentes, en testant d'autres antihelminthiques. Il serait de plus intéressant de mener des études sur des animaux parasités, et d'inclure un contrôle de l'efficacité parasitologique du traitement.

GLOSSAIRE

- Cestodes : vers plats rubanés parasites de l'intestin des vertébrés (ex : Ténia). Ils font partie de l'embranchement des Plathelminthes.



Taenia solium [46]

- Dirofilariose : Maladie du chien causée par un ver rond *Dirofilaria immitis* qui parasite le cœur.

- Filariose à *Loa loa* : filariose cutanéodermique Africaine due à des vers ronds (filaires) vivant sous la peau.

- Hétéroxène : Se dit d'un cycle parasitaire qui comprend le passage obligatoire par au moins un hôte intermédiaire.

- Hypodermes : Insecte diptère dont les larves effectuent leur cycle dans le corps d'un animal.

- Lagomorphe : Ordre de mammifères rassemblant les léporidés (lièvres et lapins) et les pikas.

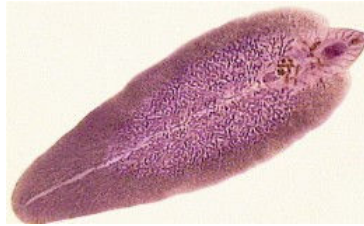
- Nématodes : Vers généralement filiformes et à section circulaire (ex : Ascaris).



Pratylenchus neglectus [47]

- Pour-on : Forme galénique consistant à administrer un médicament suivant une ligne dorso-lombaire allant de la base du cou à la base de la queue de l'animal. On retrouve des poudres et surtout des solutions.

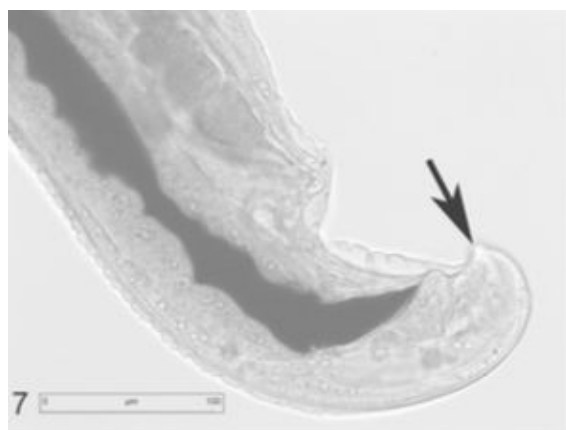
- Trématodes : Vers plats, parasites. Ils font partie de l'embranchement des Plathelminthes (ex : Douve du foie).



Fasciola hepatica – la Douve du foie [48]

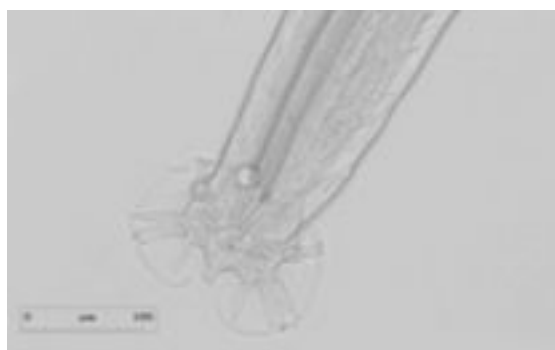
ANNEXES

Annexe 1a : Papilles à l'extrémité de la queue de la femelle [1]



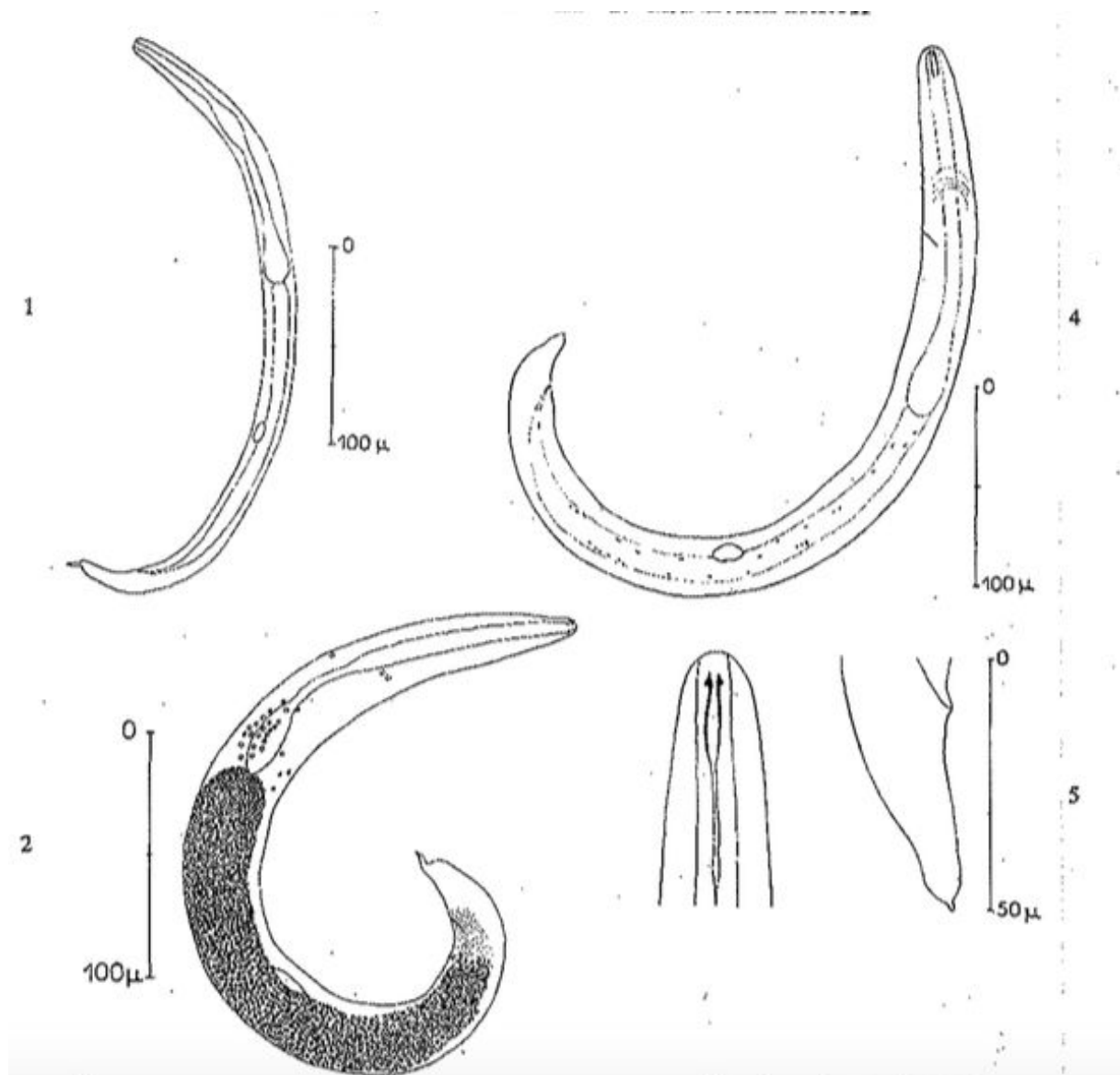
180x134mm (300 x 300 DPI)

Annexe 1b : Côtes latérales partant du tronc commun [1]



180x134mm (300 x 300 DPI)

Annexe 2 : Morphologies de Parastrongylus dujardini selon ses stades larvaires jusqu'à sa forme adulte [38] [39]



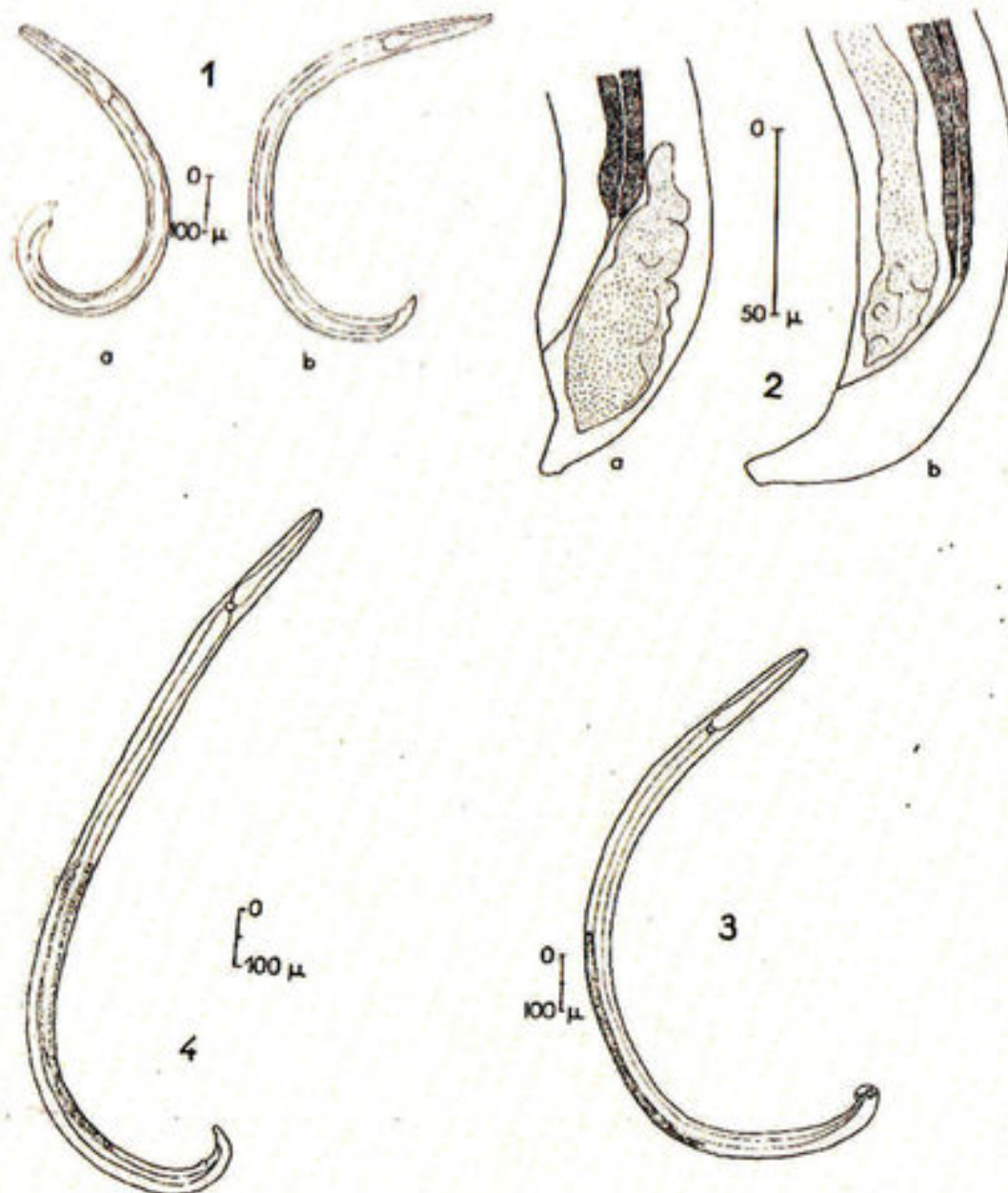


FIG. 1. — Larves 4^e stade : a) mâle, b) femelle.
 FIG. 2. — Larves 4^e stade : a) mâle, b) femelle.
 FIG. 3. — Jeune adulte mâle.
 FIG. 4. — Jeune adulte femelle.

Annexe 3 : Volumes à administrer GHLT : Tamarin lion à tête dorée (Leontopithecus chrysomelas) ; GLT : Tamarin lion doré (Leontopithecus rosalia) ; TG : Tamarin de Gould (Callimico goeldii) ; m : mâle ; f : femelle ; id : numéro d'identification ; IM : intramusculaire

Espèce	sexe	id	poids (g)	spécialité	voie	volume (ml)
GHLT	m	5391	670	ORAMEC	orale « gâteau »	2,8 pour le groupe
GHLT	m	3642	713	ORAMEC	orale « gâteau »	2,8 pour le groupe
GHLT	f	9365	742	ORAMEC	orale « gâteau »	2,8 pour le groupe
GHLT	f	4649	657	ORAMEC	orale « gâteau »	2,8 pour le groupe
GHLT	m	9305	688	IVOMECE	IM	0,027
GHLT	m	4839	599	IVOMECE	IM	0,024
GLT	m	5378	576	IVOMECE	IM	0,023
GLT	m	8728	655	IVOMECE	IM	0,026
TG	f	9363	463	ORAMEC	orale « seringue »	0,23
TG	m	1665	449	ORAMEC	orale « seringue »	0,22
TG	f	67208	461	ORAMEC	orale « seringue »	0,23
TG	m	50	528	ORAMEC	orale « seringue »	0,26

Annexe 4 : Gâteau distribué aux animaux (photo personnelle)



Annexe 5 : Administration orale à la seringue (photo personnelle)



Annexe 6 : Anesthésie gazeuse (photo personnelle)



Annexe 7 : Anesthésie de L. chrysomelas (photo personnelle)



Annexe 8 : Prélèvement sanguin (photo personnelle)



Annexe 9 : Pourcentages d'extrapolation

Voie orale « gâteau »	% extrapolation
Singe « 3642 »	11
Singe « 4649 »	13
Singe « 5391 »	12
Singe « 9365 »	24

Voie orale « seringue »	% extrapolation
Singe « 50 »	3
Singe « 1665 »	2
Singe « 9363 »	2
Singe « 67208 »	3

Voie IM	% extrapolation
Singe « 4839 »	85
Singe « 5378 »	9
Singe « 8728 »	19
Singe « 9305 »	71

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Graille M., Ferté H., Petit T., Ollivet Courtois F., Gauchot J. Y., Nougaiillon J. L., Vitaud C., Wardzynski C., Lemberger K.
Fatal *Parastrongylus dujardini* infection in captive callitrichids.
Vet pathol. 2015 Mar ;52(2):364-368
- [2] Gokbulut C. Karademir U. Boyacioglu M.
Comparison of plasma pharmacokinetic profile of ivermectin following administration of subcutaneous injection (Baymect) and oral tablet (Efektin) in goats.
Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of veterinary medicine, Aydin, Turkey. J.Vet Pharmacol. Therap 30, 489-491, 2007
- [3] Shop W.L., Mrozik H., Fisher M.H.
Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health.
Veterinary parasitology 1995 Sep;59(2):139-156.
- [4] University of Yamanashi, Faculty of Life and Environmental Sciences.
Hommage au professeur Satoshi Omura, lauréat du prix Nobel de médecine/physiologie 2015, pour ses travaux sur les bactéries du genre *Streptomyces* produisant l'ivermectine.
Photographie au microscope électronique à balayage de *S. avermitilis*.
Consulté le 10/04/2016 sur :
www.les.yamanashi.ac.jp/modules/news/index.php
- [5] Raymer B.
Approaches to the Total Synthesis of the Avermectins, 2000 Dec.
Consulté le 15/02/2016 sur :
http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/smnr_2000-2001_Raymer_Brian.pdf
- [6] RCP IVOMEC, STROMECTOL, HAS Commission de transparence
Consulté le 14/02/2016 sur :
http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ct-4123_stromectol_.pdf

- [7] Fischer M.H., Mrozik H.
Chapter I : Chemistry. In : Campbell W.C. Ivermectin and Abamectin, New-York, Springer Science and Business Media ed. New-York, 2012.
- [8] International Genetically Engineered Machine (iGEM) Foundation. Team ZJU-China.
Avermectine overexpression in *Streptomyces avermitilis*, to kill termites more efficiently. Avermectin description.
Consulté le 18/01/2016 sur :
<http://2015.igem.org/Team:ZJU-China/Description>.
- [9] Chemicalland21, Ivermectin : Product identification, Physical and Chemical properties, General description and Applications.
Consulté le 16/02/2016 sur :
www.chemicalland21.com/lifescience/phar/IVERMECTIN.htm
- [10] Ivermectin.Stanford education.
Structure/Properties.
Consulté le 18/01/2016 sur
www.web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2005/Ivermectin/structure.html.
- [11] Gonzalez Canga A., Sahagun Prieto A. M., José Diaz Liébana M., Martinez N. F., Vega M.S., Vieitez J. J.
The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species.
Vet.J 2009 Jan;179(1):25-37.
- [12] Cross H. F.
In-vitro uptake of ivermectin by adult male *Onchocerca ochengi*.
Ann Trop Med Parasitol. 1998 Sep; 92(6):711-720.
- [13] Ahmad N.
An Overview of Anthelmintics.
Department of parasitology UVAS, Lahore, Pakistan. 2013
Consulté le 12/01/2016 sur : <http://fr.slideshare.net/ShifaUIHaq/deworming-in-animals>

- [14] <http://www.cbip-vet.be/fr/texts/FAPOOOL1HL2o.php>
Consulté le 22/03/2016
- [15] Ludmerer S.W., Warren V. A., Williams B. S., Zhenq Y., Hunt D. C., Ayer M. B., Wallace M. A., Chaudhary A. G., Egan M. A., Meinke P. T., Dean D. C., Garcia M. L., Smith M.
Ivermectin and nodulisporic acid receptors in *Drosophila melanogaster* contain both gamma-aminobutyric acid-gated Rdl and glutamate-gated GluCl alpha chloride channel subunits.
Biochemistry. 2002 May 21;41(20):6548–6560.
- [16] Campbell W.C., Benz G.W.
Ivermectin : a review of efficacy and safety.
J.Vet.Pharmacol.Therap. 1984 Mar,7(1):1-16.
- [17] Pion D. S., Gardon J., Kamgno J., Gardon-Wendel N., Chippaux J. P., Boussinesq M.
Structure of the microfilarial reservoir of *Loa loa* in the human host and its implications for monitoring the programmes of Community Directed Treatment with Ivermectin carried out in Africa.
Parasitology. 2004 Nov;129(Pt5):613-626.
- [18] Chosidow O., Giraudeau B.
Oral ivermectin versus malathion lotion for difficult-to-treat head lice.
N Engl J Med. 2010 Mar 11;362(10):896-905.
- [19] Pariser M., Meinking T. L., Bell M., Ryan W. G.
Topical 0,5% Ivermectin lotion for treatment of head lice.
N Engl J Med. 2012 Nov;367(18):1687-1693.
- [20] M.Terada M., Ishii A.L., Kino H., Sano M.
Angiostrongylus cantonensis : paralysis due to avermectine B1a and ivermectin. »
Exp Parasitol. 1984 Apr;57(2):149-57.

- [21] Bourque A., Conboy G., Miller L., Whitney H., Ralhan S.
Angiostrongylus vasorum infection in 2 dogs from Newfoundland.
 Can Vet J. 2002 Nov;43(11): 876-879.

- [22] Adkesson M. J., Lamgan J. N., Paul A.
 Evaluation of control and treatment of *Gongylonema spp.* infections in Callitrichids.
 J Zoo Wildl Med. 2007 Mar;38(1):27-32.

- [23] Canga A. G., Sahagun Prieto A. M., José Diez Liébana M., Fernandez Martinez N.,
 Sierra Vega M., Garcia Vieitez J. J.
 The Pharmacokinetics and interactions of ivermectin in Humans-A Mini-review.
 AAPS J.2008 Mar; 10(1): 42-46.

- [24] Roulet A., Puel O., Gesta S., Lepage J. F., Draq M., Soll M., Alvinerie M., Pineau T.
 MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate
 ivermectin.
 Eur J Pharmacol. 2003 Jan 24;460(2-3):85-91.

- [25] Ivermectin (WHO Food Additives Series 27)
 1.Chemical identity of ivermectin.
www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v27je03.htm

- [26] Faivre S.
 Etude du régime alimentaire des Callithricidés. Application pratique pour leur
 conservation en captivité. »
 Thèse d'exercice, Docteur Vétérinaire, Lyon, 2008, 19.

- [27] Collectif : National Research Council US Committee on Well-Being oh Nonhuman
 Primates.
 New World Monkeys : Callitrichids.
 In : The psychological Well-Being of nonhuman Primates
 National Academy Press US Ed. Washington DC, 1998,6.

- [28] Mittermeier R. A., Rylands A. B., Wilson D. E.
Integrated Taxonomic Information System (ITIS) : Taxonomy & Nomenclature
Callitrichidae, Gray 1821, Taxonomic Serial N°572774.
Handbook of the Mammals of the World. Vol. 3 Primates. Lynx Ediciones, Barcelona,
Spain, 2013.
- [29] Quintard B.
Techniques de contraception chez les callithricidés.
21ème Colloque de la société Francophone de Primatologie, Mulhouse 16/10/2008.
Consulté le 16/02/2016 sur :
http://www.afvpz.com/IMG/pdf/Contraception_des_callithricides_QUINTARD.pdf
- [30] Zoo – Domaine de Pescheray 72370 Le Breil sur Mérisse. Les callithricidés.
Consulté le 20/02/2016 sur :
www.pescheray.com/item_img/medias/documents/goeldi.pdf – domaine zoologique
pescheray
- [31] Zoo et parc de Thoiry.
Les animaux du parc à pied, le tamarin lion à tête dorée
Consulté le 10/01/2016 sur :
www.thoiry.net/fr/animaux/tamarin-lion-a-tete-doree
- [32] www.primates.com/primates/callitrichidae.html
- [33] Animal Diversity Web, University of Michigan, Museum of Zoology
Mammal anatomy
Consulté le 20/02/2016 sur :
www.animaldiversity.org
- [34] Zoo de la Palmyre,
Les programmes de conservation.
Consulté le 02/01/2016 sur :
www.zoo-palmyre.fr/fr/conservation

- [35] Lion Tamarins of Brazil Fund
Tamarin Tales.
Consulté le 02/01/2016 sur :
<http://ltbf.org/wp-content/uploads/>
- [36] Proyecto Titi. Conserving the Critically Endangered Cotton-top Tamarin in Colombia.
About Cotton-top Tamarins
Consulté le 15/01/2016 sur :
<http://www.proyectotiti.com/en-us/Cotton-Top-Tamarins/About-Cotton-Top-Tamarins>
- [37] Drozd J., Dody J.M.
Angiostrongylus dujardini sp. n. (Nematoda: Metastrongyloidea) parasite de *Apodemus sylvaticus* et *Clethrionomys glareolus*.
Bull Soc Zool Fr. 1970;95:659-668.
- [38] Drozd J., Dody J.M.
Evolution morphologique, migration et chronologie du cycle de *Angiostrongylus (Parastrongylus) dujardini* (Nematoda Metastrongyloidea) chez ses hôtes définitifs.
Bull Soc Sc Bretagne 1970,45:229-239.
- [39] Drozd J., Dody J. M.
Etude des morphologie et évolution larvaires de *Angiostrongylus (Parastrongylus) dujardini* (Nematoda Metastrongyloidea) infestation des mollusques hôtes intermédiaires.
Ann Parasitol Humaine Comparée. 1971(3) :265-276.
- [40] Perez R, Godoy C, Palma C, Cabezas I, Muñoz L, Rubilar L, Arboix M, Alvinerie M.
Plasma profiles of ivermectin in horses following oral or intramuscular administration.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2003 Aug;50(6):297–302.
- [41] Gokbulut C., Cirak V. Y., Senlik B., Aksit D., Dirmaz M., McKellar Q. A.
Comparative plasma disposition, bioavailability and efficacy of ivermectin following oral and pour-on administrations in horses.
Vet Parasitol. 2010 May 28;170(1-2):120–126.

- [42] Daurio C. P., Cheung E. N., Jeffcoat A. R., Skelly B. J..
Bioavailability of ivermectin administered orally to dogs.
Veterinary Research Communications. 1992, vol.16, Issue 2, pp125-130.
- [43] Office Fédéral de la Sécurité Alimentaire et des Affaires Vétérinaires OSAV.
Confédération Suisse.
Thème : Protection des animaux, Expériences sur les animaux.
Consulté le 25/02/2016 sur :
<http://www.blv.admin.ch/themen/tierschutz/00777/>
- [44] Préparation de phases mobiles pour HPLC,
Document Qualité interne du Laboratoire TOXALIM, INRA, Toulouse, ref : MO-TMR-
PREP-001 le 17/04/2013.
- [45] Extraction et dosage des lactones macrocycliques dans le plasma et dans le lait par
Chromatographie Liquide Haute Performance.
Document Qualité interne du Laboratoire TOXALIM, INRA, Toulouse, ref : MO-
TMR-EXTR-001 le 08/01/2014.
- [46] Walsh. M.
Department of Epidemiology and Biostatistics in the School of Public Health at the State
University of New York.
A consideration of the epidemiology of infectious diseases.
Adlt Taenia solium.
Consulté le 28/04/2016 sur :
www.infectionlandscapes.org/2012/08/tapeworms.html
- [47] Soil Quality
Fact Sheets, root lesion Nematode, microscope image of a root lesion nematode.
Consulté le 28/04/2016 sur :
www.soilquality.org.au/factsheets/root-lesion-nematode

- [48] HubPages, Education and Science, Life Sciences, Zoology
Phylum Platyhelminthes : General Characters, Class : Trematoda, photo of *Fasciola hepatica*.
Consulté le 28/04/2016 sur :
www.hubpages.com/education/platyhelminthes

RESUME

Une nouvelle forme d'infestation des singes Callithricidés en captivité par *Parastrongylus dujardini* est à l'origine d'une mortalité importante.

Un traitement empirique par ivermectine est mis en place en urgence chez ces animaux de manière préventive et curative, au zoo de La Palmyre (Charente Maritime).

Ce travail consiste en une étude expérimentale pharmacocinétique visant à déterminer l'évolution des concentrations plasmatiques de l'ivermectine, chez les Callithricidés, après administration par différentes voies : voie orale dans l'alimentation, voie orale forcée à la seringue, et voie intramusculaire.

Les dosages de l'ivermectine sont réalisés par HPLC. La détermination du $t_{\max}$, de la $C_{\max}$ et de la demi-vie montre que la voie intra musculaire donne les meilleurs résultats. La mesure de l' $AUC_{\inf}$ montre également une meilleure exposition à l'invermectine par la voie intramusculaire.

Il reste difficile d'affirmer l'efficacité des taux sériques obtenus dans cette étude, faute de références publiées dans la littérature et de l'étude de l'efficacité parasitologique.

Malgré tout, l'étude pharmacocinétique, la comparaison aux données existantes pour d'autres familles d'animaux, ainsi que l'aspect pratique, tendent à montrer la supériorité de la voie d'administration intramusculaire.

Le faible effectif d'animaux utilisés appartenant à différentes espèces, ainsi que l'absence de contrôle parasitologique, nécessitent des études complémentaires pour adapter le traitement.

MOTS CLES

Pharmacocinétique, Ivermectine, Callithricidés, *Parastrongylus dujardini*, Dosage HPLC.

SERMENT de GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.