

EFFETS DU SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE SUR L'ORGANOGENESE DU SQUELETTE DE POULET. ETUDE PAR ANALYSEUR D'IMAGES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Sandrine, Monique, Christiane GRAILLE
Née, le 13 mars 1973 à CLERMONT-FERRAND (Puy-de-Dôme)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Jean SAUTET**

JURY

PRESIDENT :
M. Claude CARATERO

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Jean SAUTET
M. Xavier BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur Caratero
De l'Université Paul-Sabatier de Toulouse
Histologie et embryologie
Qui nous a fait l'honneur de présider le jury de notre thèse.
Remerciements et hommages respectueux.

A NOTRE JURY DE THESE :

Monsieur le Professeur Sautet
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Anatomie
Qui nous a guidé dans l'élaboration de ce travail et permis de le mener à bien.
Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude et de notre profond respect

Monsieur le Professeur Berthelot
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie de la Reproduction
Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse
Qu'il veuille bien accepter ici le témoignage de notre profond respect.

A l'ensemble du personnel du service d'Anatomie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Pour leur sympathie, leur disponibilité et leur aide technique à la réalisation de ce travail.

A l'ensemble de l'équipe de recherche de la Faculté Vétérinaire de l'Université Autonome de Barcelone pour le travail qu'ils ont effectué sur les embryons de poulet.

Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

A Monsieur le Professeur Concordet, qui nous a guidé dans notre étude statistique.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

A l'ensemble du personnel de la Bibliothèque de l'E.N.V.T. pour son aide précieuse lors de la rédaction de la synthèse bibliographique de cette thèse. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude.

A Monsieur le Professeur Berthelot, pour sa disponibilité de chaque instant et son aide au-delà de ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre vive gratitude et de notre profond respect.

A vous tous qui m'avez supportée pendant ce travail (et le reste du temps), à Chris, mes parents, ma sœur et mes amis ; recevez ici toute ma tendresse et ma reconnaissance.

A Martial Manesse, en continuité de ses travaux...

A Lui.....

Toulouse, 2002

NOM : GRAILLE

PRENOM : SANDRINE

TITRE : EFFETS DU SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE SUR L'ORGANOGENESE
DU SQUELETTE APPENDICULAIRE DE L'EMBRYON DE POULET. ETUDE PAR
ANALYSEUR D'IMAGES

RESUME : Une étude morphométrique a l'aide d'un analyseur informatique d'images est réalisée sur les six os du squelette appendiculaire de foetus de poulet a 15.5 jours d'incubation. L'auteur cherche si les mesures des os sont différentes entre des populations embryonnaires témoins (témoins " purs ", témoins avec en trou dans la coquille, témoins "solvant") et une population Embryonnaire exposée au sulfoxyde d'albendazole des la cinquante quatrième heure d'incubation. Les résultats des analyses de la variance ne montrent pas de différence significative dans la mesure des os des populations embryonnaires étudiées. Cependant il apparait systématiquement une différence significative entre les témoins " purs " et les embryons exposes au sulfoxyde d'albendazole. Cette différence semble résulter de divers facteurs : le fait de trous la coquille, d'injecter du solvant et du sulfoxyde d'albendazole. Pour mettre en évidence l'effet du seul sulfoxyde d'albendazole sur le développement embryonnaire, d'autres études seront nécessaires. L'auteur envisage dans sa discussion un nouveau protocole expérimental pour mieux cerner les effets du sulfoxyde d'albendazole.

MOTS-CLES : BENZIMIDAZOLE/ALBENDAZOLE/NETOBIMIN/EMBRYON DE
POULET/EMBRYOGENESE/DEVELOPPEMENT
EMBRYONNAIRE/TERATOLOGIE/TOXICITE/LEGISLATION/MEDICAMENT/MORPHOMETRIE

ENGLISH TITLE : EFFECTS OF ALBENDAZOLE SULPHOXYDE ON THE
DEVELOPMENT OF CHICKEN EMBRYO LIMBS. STUDY BY COMPUTER
ANALYSER

PREFACE

Quelle histoire pour un chapeau ! Pour avoir refusé de saluer le couvre-chef du gouverneur, Guillaume Tell accepte de prendre le risque le plus redoutable que puisse prendre un père. Que mes amis suisses me pardonnent ! Je ne m'attaque qu'à un mythe, qui jure avec la sagesse traditionnelle des Helvètes du canton d'Uri. Mais jouer à l'arbalète russe avec sa progéniture, voilà le pari le plus criminel, le risque le moins héroïque qui soit.

Et pourtant, à des degrés divers, c'est le syndrome de Guillaume Tell qui inspire la plupart de nos choix de société.

Ce sont les petits Américains qui paieront les dettes écrasantes accumulées par leurs parents. C'est notre descendance qui aura, pendant des millénaires, la lourde charge de se protéger contre les déchets nucléaires ou industriels que nous aurons entassés. Ce sont les milliards d'enfants de demain qui devront endiguer eux-mêmes leur prolifération, répartir des ressources devenues insuffisantes et forger de nouvelles valeurs morales dans un monde de béton et d'asphalte, sans rouge-gorge, sans rhinocéros, sans papillon.

En attendant, nous perfectionnons, nous accumulons, nous disséminons des armes conventionnelles de plus en plus meurtrières, nous tentons de garder en laisse les fusées de la fin du monde, nous multiplions les Tchernobyl en puissance, nous éliminons les espèces vivantes par centaines de milliers, nous perçons les derniers atolls et nous réchauffons la planète au risque de déclencher un déluge sans pluie. Quant à moi, je recherche, sans succès, le prénom du fils de Guillaume Tell.

Petits enfants d'Aubervilliers, chantés par Prévert et Kosma, petits enfants du monde entier, vous avez tous une pomme sur la tête.

Jacques-Yves Cousteau
De l'Académie Française
Extrait du livre de J-C. Balouet et E. Alibert
Le grand livre des espèces disparues
Editions Ouest France

(verso page préface)

TABLE DES MATIERES

Introduction.	13
I- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE :	14
A- Exemples de benzimidazoles embryotoxiques :	14
1- Le parbendazole.	15
2- Le cambendazole.	17
3- L'oxfendazole.	18
4- L'albendazole.	20
B- Le nétohimin, prodrogue de l'albendazole :	24
1- Caractères physiques et propriétés chimiques du nétohimin.	24
2- Métabolisme et pharmacocinétique du nétohimin.	25
Principaux métabolites du nétohimin.	26
Absorption et distribution du nétohimin.	30
Biotransformations gastro-intestinales du nétohimin et de ses métabolites.	31
Biotransformations hépatiques des métabolites du nétohimin.	34
Elimination du nétohimin.	35
Facteurs influant sur la pharmacocinétique du nétohimin.	36
Voie d'administration.	36
Galénique.	37
Différences interspécifiques.	38
Parasitisme et âge.	39
Régime alimentaire.	40
Gestation.	40
Sexe.	41
Coadministration d'une autre molécule.	42
3- Spectre d'activité et mode d'action du nétohimin.	45
Chez les bovins.	45
Chez les ovins.	48
Chez les caprins.	50
Chez les mouflons.	50
Chez les porcins.	51
4- Toxicité du nétohimin.	53
Toxicité aiguë du nétohimin.	53
Toxicité subchronique du nétohimin.	54
Effets mutagènes du nétohimin.	54
Effets du nétohimin sur l'opérateur.	54
Effets du nétohimin sur l'environnement.	54
Toxicité du nétohimin sur le développement embryonnaire.	55
C- Législation du médicament vétérinaire et toxicité :	58

D- L'embryon de poulet et la tératologie :	61
1- Vers un nouveau modèle d'évaluation de l'embryotoxicité ?	61
2- Quelques exemples d'étude.	65
E- La morphométrie et l'embryotoxicité :	68
II- ETUDE EXPERIMENTALE :	70
A- Matériel et méthodes :	70
1- Le matériel biologique.	70
Les œufs.	70
Le sulfoxyde d'albendazole.	70
Le solvant.	70
2- Le matériel technique.	70
Couveuse ou incubateur.	70
Matériel pour réaliser les injections.	70
Matériel de coloration.	70
Matériel de dissection.	71
L'analyseur d'images.	71
3- Méthodes.	71
De l'œuf à l'embryon.	71
Les différents traitements.	71
La coloration.	72
Les mesures.	72
B- Résultats :	74
1- Répétition des mesures.	74
2- Expérience n° 1.	76
3- Expérience n° 2.	83
4- Expérience n° 3.	85
III- DISCUSSION :	88
A- Discussion de la synthèse bibliographique :	88
1- La pérennisation des erreurs scientifiques.	88
2- Les benzimidazoles : une classe pharmaceutique déchuée ou des antiparasitaires en puissance ?	89
3- Législation et innocuité des médicaments.	90
4- La morphométrie en tératologie.	90
B- Discussion sur l'embryotoxicité en général :	91
1- Le risque tératogène : un risque en pleine expansion ?	91
2- Exemple de gestion du risque tératogène selon différentes firmes pharmaceutiques.	91

3- Législation, modèle expérimental et tératologie.	92
Signification statistique.	92
Doses toxique et thérapeutique.	92
Comment une étude de screening sur l'embryon de poulet pourrait s'intégrer dans la législation ?	93
4- Difficultés de mise en évidence du risque tératogène.	93
Réunir toutes les conditions, mythe ou réalisable ?	93
Le choix de l'espèce en toxicité du développement.	94
5- Difficultés d'interprétation en tératologie.	94
C- Discussion de l'étude expérimentale :	95
1- Matériel et méthodes.	95
Le matériel biologique (œufs, solvant et sulfoxyde d'albendazole).	95
Méthodes : De l'œuf à l'embryon.	95
Méthodes : Les différents traitements.	96
Méthodes : La coloration.	96
2- Résultats :	96
Expérience n° 1	97
Expérience n° 2 et n° 3	97
IV- CONCLUSIONS GENERALES :	98
Références bibliographiques :	99
Liste bibliographique des textes officiels :	115
Annexe A : Tableau de données brutes pour la réitération des mesures.	117
Annexe B : Tableau de données brutes pour l'expérience n°1.	119
Annexe C : Représentation graphique expérience n°1, grand diamètre.	126
Annexe D : Représentation graphique expérience n°1, périmètre.	127
Annexe E : Représentation graphique expérience n°1, surface.	128
Annexe F : Tableau de données brutes pour l'expérience n°2.	129
Annexe G : Représentation graphique expérience n°2, grand diamètre.	136
Annexe H : Représentation graphique expérience n°2, périmètre.	137
Annexe I : Représentation graphique expérience n°2, surface.	138
Annexe J : Tableau de données brutes pour l'expérience n°3.	139
Annexe K : Représentation graphique expérience n°3, grand diamètre.	145
Annexe L : Représentation graphique expérience n°3, périmètre.	146
Annexe M : Représentation graphique expérience n°3, surface.	147

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Formule du thiabendazole, chef de file des benzimidazoles (Delatour <i>et al.</i> , 1974).	14
Figure 2 : Formule du parabendazole (Lapras <i>et al.</i> , 1973c).	15
Figure 3 : Formule du cambendazole (Delatour <i>et al.</i> , 1974).	17
Figure 4 : Formule de l'oxfendazole (Delatour <i>et al.</i> , 1983).	18
Figure 5 : Formule de l'albendazole (Marriner <i>et al.</i> , 1980).	20
Figure 6 : Formule du nétohimin (Delatour <i>et al.</i> , 1986).	25
Figure 7 : Formule de l'albendazole (Marriner <i>et al.</i> , 1980).	26
Figure 8 : Formule du sulfoxyde d'albendazole (Marriner <i>et al.</i> , 1980).	26
Figure 9 : Formule de la sulfone d'albendazole (Marriner <i>et al.</i> , 1980).	26
Figure 10 : Formule du 5 propylsulfinyl -1H-benzimidazole-2-amine (Delatour <i>et al.</i> , 1986).	27
Figure 11 : Formule du 5 propylsulfonyl -1H-benzimidazole-2-amine (Delatour <i>et al.</i> , 1986).	27
Figure 12 : Biotransformations du nétohimin en albendazole par la flore gastro-intestinale (Delatour <i>et al.</i> , 1986).	32
Figure 13 : Biotransformations gastro-intestinales du nétohimin (Lanusse <i>et al.</i> , 1990a).	33
Figure 14: Activité comparée des enzymes du métabolisme énergétique chez l'hôte et le parasite d'après Talon, 1989.	52
Figure 15 : Membre pelvien après extraction automatique par l'ordinateur.	73
Figure 16 : Représentation graphique de la taille moyenne du grand diamètre de Férêt en mm dans chaque échantillon (témoins et traités).	77
Tableau 1 : Variation du pourcentage d'efficacité de l'albendazole sur les larves 4 d' <i>Ostertagia ostertagi</i> en fonction de la posologie et des publications.	21
Tableau 2 : Différences pharmacocinétiques observées pour le sulfoxyde d'albendazole (AlbSO) en fonction de la forme galénique.	37
Tableau 3 : Différences pharmacocinétiques observées pour la sulfone d'albendazole (AlbSO ₂) en fonction de la forme galénique.	37
Tableau 4 : Différences pharmacocinétiques au niveau de la concentration maximale (C _{max}), de l'aire sous la courbe (AUC), du temps de résidence plasmatique moyen (MRT) et du temps de demi-vie (T _{1/2}) pour le sulfoxyde d'albendazole (AlbSO) et la sulfone d'albendazole (AlbSO ₂) selon le sexe.	41
Tableau 5 : Réitération des mesures : données statistiques.	74
Tableau 6 : Réitération des mesures : résultats de l'analyse de la variance.	75
Tableau 7 : Résultats de l'analyse de la variance de l'expérience n°1.	79
Tableau 8 : Résumé et conclusions des diverses analyses de la variance faites lors de l'expérience n°1.	80
Tableau 9 : Résultats de l'analyse de la variance de l'expérience n°2.	84
Tableau 10 : Résultats de l'analyse de la variance de l'expérience n°3.	87

INTRODUCTION

Personne n'oubliera jamais la dramatique utilisation du thalidomide dans les années 60. Cette molécule représentait « une bien grosse pomme » sur la tête des femmes enceintes. Ce médicament, destiné initialement à calmer les « malaises de la grossesse » a créé à lui-seul un énorme malaise pharmaceutique et scientifique à la fois. Le thalidomide représente encore aujourd'hui le tératogène par excellence. Cependant, comment garantir qu'il n'y aura pas d'autres accidents tératologiques ? L'étude de l'embryotoxicité des médicaments est nécessaire et se doit d'être toujours plus performante comme toute étude scientifique actuelle.

C'est en 1989 que ce travail débuta. Fabre, Berthelot et Ferney rapportent une observation clinique dans la Revue de Médecine Vétérinaire : dans un troupeau ovin du Sud Ouest, l'embryotoxicité du nétobimin éclate littéralement avec 75% des agneaux présentant des malformations graves.

Dans la suite logique de ces observations, en étroite collaboration avec la Faculté Vétérinaire de l'Université Autonome de Barcelone, l'étude du pouvoir tératogène du sulfoxyde d'albendazole débute à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

En 1993, c'est au tour de Manesse de creuser un peu plus le sujet. Son objectif est de créer un modèle expérimental qui permettrait d'approcher les mécanismes d'action du sulfoxyde d'albendazole et éventuellement de prévenir ses effets indésirables. Il étudie l'embryon de poulet.

Un fois le modèle mis en place, Pagèze apportera l'outil de mesure nécessaire à l'estimation des effets embryotoxiques en 1995. Il propose d'utiliser la morphométrie comme moyen d'étude de l'embryotoxicité sur le squelette.

Héritière de ce patrimoine expérimental, nous nous proposons d'étudier les effets du sulfoxyde d'albendazole sur l'organogenèse du squelette appendiculaire de l'embryon de poulet, ceci grâce à un analyseur informatique d'images.

Nous présentons nos recherches et résultats expérimentaux après une synthèse bibliographique sur les benzimidazoles, la législation de l'embryotoxicité, l'embryon de poulet et la morphométrie. Une courte discussion suit notre étude expérimentale avant de conclure.

I- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE :

Pour mieux comprendre et discuter les effets du sulfoxyde d'albendazole, évalués par une nouvelle méthode, il faut connaître des éléments sur la classe des benzimidazoles, connaître le nétohimin qui est un probenzimidazole, connaître la législation du médicament vétérinaire en terme d'embryotoxicité, et connaître des modèles d'évaluation de cette toxicité particulière (embryon de poulet; morphométrie).

Ainsi notre revue bibliographique s'attachera à présenter quelques exemples de la classe des benzimidazoles, à décrire plus précisément le nétohimin, à expliquer la législation du médicament vétérinaire en terme de risque tératogène et à présenter quelques modèles d'évaluation de ce risque (embryon de poulet ; morphométrie).

A- Exemples de benzimidazoles embryotoxiques :

Le succès remporté par le thiabendazole (Fig.1) tant comme fongicide que comme anthelminthique fut à l'origine de nombreuses recherches dans la série du benzimidazole. Ainsi depuis sa production en 1961 par Brown *et al.* (Brown *et al.*, 1961), d'autres composés ont été découverts :

- le parbendazole (Actor *et al.*, 1967) ;
- le cambendazole (Hoff *et al.*, 1970) ;
- le mébendazole (Brugman *et al.*, 1971) ;
- l'oxibendazole (Theodorides *et al.*, 1973) ;
- le fenbendazole (Baeder *et al.*, 1974) ;
- l'oxfendazole (Averkin *et al.*, 1975) ;
- l'albendazole (Theodorides *et al.*, 1976a) ;
- le fébantel (Delatour *et al.*, 1983) ;
- le nétohimin (Nafissi-Varchei, 1983) ;
- le triclabendazole (Boray *et al.*, 1983) ;
- le luxabendazole (Corba *et al.*, 1986).

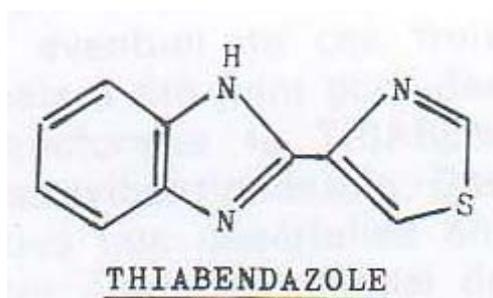


Figure 1 : Formule du thiabendazole, chef de file des benzimidazoles (Delatour *et al.*, 1974).

Dans la classe pharmacologique des anthelminthiques, la recherche vétérinaire est très active. Des raisons économiques la pousse bien au-delà du sillon laissé par la recherche en médecine humaine. Cependant cette extraordinaire prolifération a connu des accidents tératologiques chez l'animal en l'absence de réglementation sur le risque tératogène.

Quelques molécules seront présentées afin de mieux connaître la classe des benzimidazoles, d'illustrer son pouvoir embryotoxique et de rappeler que l'étude de l'embryotoxicité est plus que souhaitable (et obligatoire) dans notre société où nous parlons chaque jour du principe de précaution.

1- Le parbendazole.

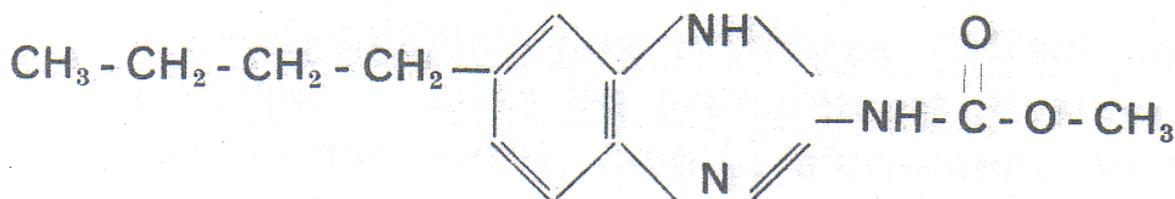


Figure 2 : Formule du parbendazole (Lapras *et al.*, 1973c).

Le parbendazole est un anthelminthique dérivé du benzimidazole :

le N-2 (5-butyl-benzimidazole) carbamate de méthyle ou SKF 29044 (Fig.2).

En 1973, il était commercialisé sous différents noms déposés : Helmipan^{N.D.} ; Niverzol^{N.D.} ; Vurmix^{N.D.} ; Parbentec^{N.D.} ; Veroneze^{N.D.} ; Veroxigan^{N.D.} ; Pigomix^{N.D.}.

Il s'agit d'un anthelminthique utilisé surtout dans le traitement des strongyloses digestives des ruminants et des porcins. La posologie habituelle est de 30 mg/kg en prise unique.

Actuellement, cet anthelminthique n'est plus commercialisé.

A dose thérapeutique, la toxicité générale du parbendazole est faible. Chez l'agneau, seuls quelques cas de paralysie ont été rapportés, mais après administration de fortes doses de parbendazole (Prozesky *et al.*, 1982). Aussi chez le lapin, lors d'expérimentations visant à prouver l'embryotoxicité du parbendazole chez différentes espèces de laboratoire, les lapines traitées à des doses supérieures ou égales à 120 mg/kg ont présenté des troubles généraux et digestifs (anorexie, diarrhée) pouvant entraîner la mort de l'animal (Lapras *et al.*, 1973b). L'autopsie de ces animaux a permis de constater la présence de nombreux ulcères sur la muqueuse de l'estomac.

Par ailleurs, le parbendazole ne perturbe pas le développement fœtal, et même s'il passe dans le lait, ne provoque pas de mortalité périnatale et n'entraîne aucun trouble, ni de la croissance, ni du comportement (Mercier-Parot, 1976).

Le parbendazole est un nouvel exemple de l'influence des facteurs externes sur le développement embryonnaire. Comme pour le thalidomide, son pouvoir tératogène a été décelé en thérapeutique, puis retrouvé ensuite au laboratoire.

En effet, en 1973, Lapras et ses collaborateurs rapportent une observation clinique dans le Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon (Lapras *et al.*, 1973c). Dans un troupeau auvergnat de 900 brebis, l'utilisation de parbendazole à 30 mg/kg entre le 9^{ème} et le 21^{ème} jour de gestation a conduit à des malformations, principalement du système osseux, pour 25% des agneaux naissants et à une réduction de 20% de la natalité. Pour les éleveurs, cet accident thérapeutique ne pouvait être prévisible à l'époque puisque aucune contre-indication chez les femelles gravides n'était formulée par le fabricant. Cependant une expérimentation de O'Brien conduite sur la brebis en 1970, notait déjà des fusions de corps vertébraux en régions thoracique postérieure, lombaire et sacrée chez des agneaux nés de brebis traitées à 60 mg/kg (soit deux fois la dose thérapeutique) le 17^{ème} jour de gestation (O'Brien, 1970).

Pour démontrer définitivement l'embryotoxicité du parbendazole, Lapras et ses collaborateurs ont mené des études expérimentales sur différentes espèces de laboratoire : rat, souris et lapin (Lapras *et al.*, 1973 a, b).

Chez le rat, le parbendazole est embryotoxique dès la dose de 10 mg/kg (soit 3 fois moins que la posologie habituelle chez le mouton); le pourcentage de résorption par femelle nidée est de 21,22% ; le poids moyen des fœtus est diminué de 24% ; le pourcentage de femelles gravides présentant des fœtus malformés atteint 44,44% et le pourcentage de fœtus malformés est de 17%. Pour des doses plus élevées, ces pourcentages augmentent. Cependant, sur le plan

quantitatif, il existe une relation dose-effet pour l'embryotoxicité et la tératogénèse en deçà de 25 mg/kg ; au-delà de cette dose, aucune portée n'arrive à terme. Les malformations observées chez le rat rappellent dans l'ensemble celles décrites par les mêmes auteurs chez le mouton. La fréquence des anomalies des membres et des doigts (micromélie, ectrodactylie) semble être l'une des caractéristiques de l'action du parabendazole chez le rat (Lapras *et al.*, 1973a). Ces résultats sont en accord avec ceux des expérimentations de Mercier-Parot publiés en 1976 (Mercier-Parot, 1976).

Chez la souris, l'activité embryotoxique du parabendazole apparaît nettement à partir de 40 mg/kg. Elle se traduit par une augmentation des résorptions embryonnaires, une diminution du nombre de fœtus et du poids moyen de ceux-ci. L'effet tératogène du produit se manifeste dès la dose de 10 mg/kg et est encore plus net à 40 mg/kg. Le type de malformations observées chez la souris rappelle celui apparu chez le rat et constaté également chez les agneaux nés de mères traitées au parabendazole (Lapras *et al.*, 1973b). Dans une autre expérimentation, le parabendazole s'est avéré beaucoup moins embryotoxique chez la souris que chez le rat. Cependant des sensibilités différentes selon les lignées de souris ont été mises en évidence (Mercier-Parot, 1976).

Chez le lapin, aucun effet embryotoxique du parabendazole n'a été mis en évidence par Lapras et ses collaborateurs. En ce qui concerne les effets tératogènes proprement dits, rien n'a été observé dans les conditions de l'essai, après examen de 149 fœtus issus de mères traitées à des doses allant de 20 à 1000 mg/kg. Par contre une toxicité intestinale a été observée chez les lapines (Lapras *et al.*, 1973b). Ces résultats sont confirmés par Mercier-Parot en 1976.

Duncan *et al.* en 1974 n'ont noté ni effet embryotoxique, ni anomalie chez le hamster avec des doses de 25 ; 50 et 100 mg/kg.

D'autres observations négatives ont été rapportées chez la vache (Miller *et al.*, 1974) et chez la truie (Hancock *et al.*, 1974).

L'activité tératogène du parabendazole n'est donc pas identique dans toutes les espèces. Plusieurs explications présentées ci-après sont possibles.

- Des différences d'absorption intestinale du parabendazole ou des métabolites responsables de l'activité tératogène.

Les lapines de l'expérimentation de Lapras *et al.* présentaient des lésions intestinales telles que l'on peut se demander si l'absorption du parabendazole a eu lieu. L'absence d'activité tératogène du parabendazole s'explique peut-être dans cette espèce par une absence d'absorption au niveau digestif.

Par ailleurs, chez le porc, l'administration ne pouvant se faire par sondage ou par gavage en une dose unique, le parabendazole est mélangé à la nourriture. L'absorption est par conséquent étalée sur plusieurs heures et l'effet tératogène n'apparaît pas (Lapras *et al.*, 1973b).

- Des différences dans le métabolisme ou le passage transplacentaire du parabendazole.

- Des différences de doses et de période de traitement :

L. Mercier-Parot rapporte en 1976 une expérimentation de Lemon et Hancock de 1974 portant sur des brebis traitées au parabendazole à 30 mg/kg. La dose utilisée et les périodes de traitement étaient différentes de celles employées par Lapras *et al.* en 1973. Lemon et Hancock, ne constatant aucune modification dans le poids des descendants, dans la durée de gestation, et très peu de malformations (deux chez les traités contre une chez les témoins), avaient conclu à l'absence d'effet tératogène du parabendazole chez les ovins (Lemon *et al.*, 1974).

L'activité tératogène du parbendazole semble s'expliquer par des propriétés antimitotiques. Lapras *et al.*, 1975, ont démontré des effets antimitotiques généraux *in vitro* sur sub-cultures de leucocytes de mouton et d'homme ; sur explants primaires de rein de porc et sur cellules tumorales humaines KB ; et, *in vivo*, sur le carcinome ascitique d'Ehrlich et sur la leucémie spontanée de la souris AKR (Lapras *et al.*, 1975).

Le parbendazole illustre donc le pouvoir embryotoxique des benzimidazoles (même s'il ne s'exprime pas dans toutes les espèces). L'embryotoxicité s'explique par des propriétés antimitotiques. Le parbendazole a servi dans de nombreux modèles de recherche du risque tératogène.

2- Le cambendazole.

Le cambendazole est un anthelminthique dérivé du benzimidazole :

le N-5 (2 (4'-thiazolyl) benzimidazole) carbamate d'isopropyl ou MK 905 (Fig.3). Il a été découvert en 1970 par Hoff *et al.* (Hoff *et al.*, 1970).

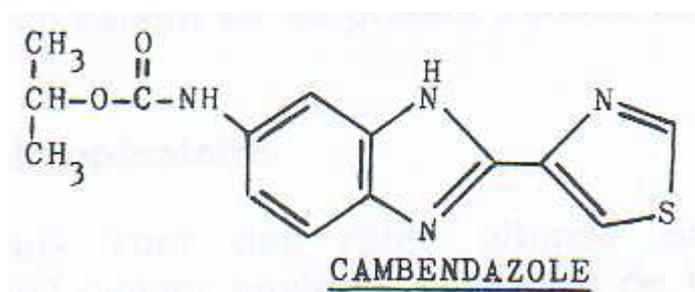


Figure 3 : Formule du cambendazole (Delatour *et al.*, 1974).

En 1975, il était commercialisé sous différents noms déposés : Bonlam^{N.D.}, Arcam^{N.D.}. Cet anthelminthique était utilisé dans les strongyloses digestives des ruminants et des porcins à la dose orale de 25 mg/kg en prise unique. Actuellement, il n'est plus commercialisé.

La toxicité générale du cambendazole sur les animaux traités est faible ; seuls quelques chocs anaphylactiques ont été rapportés chez les ovins avec œdème pulmonaire et hydrothorax (Prichard, 1978). Il n'en est pas de même pour sa toxicité sur le développement embryonnaire.

Delatour *et al.* ont montré en 1974 que le cambendazole (produisant 73,8% d'anomalies externes à la dose de 10,06 mg/kg) était schématiquement trois fois plus tératogène chez le rat que le parbendazole (qui produit 75% d'anomalies externes à 24,7 mg/kg). Les manifestations embryologiques dues au cambendazole ne s'exercent pleinement qu'à partir d'une concentration seuil dans les tissus biologiques et donc qu'à partir d'une dose comprise entre 7,55 et 10,06 mg/kg chez le rat (Delatour *et al.*, 1974).

Dans l'espèce ovine, le cambendazole est embryotoxique à des doses supra-thérapeutiques (50 mg/kg et 75 mg/kg) (Delatour *et al.*, 1975a).

Les malformations induites chez le rat et le mouton sont identiques ou voisines sur le plan qualitatif. Elles semblent être dues à des propriétés antimitotiques de type mitoclasique (Delatour *et al.*, 1975b). On observerait en effet une désorganisation des microtubules du fuseau mitotique (Delatour *et al.*, 1976). Ces propriétés ont été mises en évidence, *in vitro*, sur cellules humaines (leucocytes, HeLa, KB), sur cellules de mouton et de porc ; *in vivo* expérimentalement, sur le carcinome ascitique d'Ehrlich de la souris Swiss et sur la leucémie de la souris DBA/2 ; et *in vivo* cliniquement, sur tumeurs cancéreuses spontanées du chien. L'activité antimitotique s'exerce donc aussi bien sur cellules normales que cancéreuses (Delatour *et al.*, 1975b).

Le cambendazole, comme le parabendazole, illustre donc le pouvoir embryotoxique de la classe des benzimidazoles. Ce pouvoir s'explique par des propriétés antimitotiques. Compte tenu de la faible différence entre dose thérapeutique et dose embryotoxique, cet anthelminthique n'est plus commercialisé.

3- L'oxfendazole.

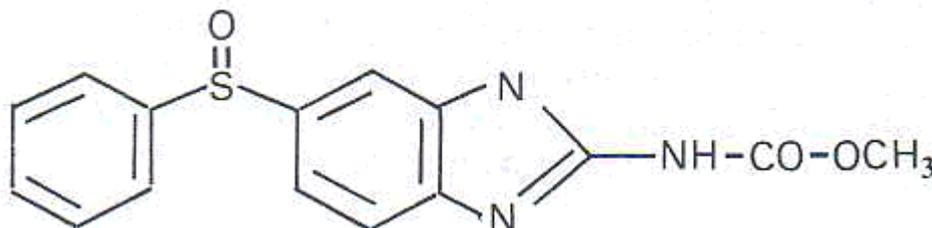


Figure 4 : Formule de l'oxfendazole (Delatour et al., 1983).

L'oxfendazole est un anthelminthique de la classe des benzimidazoles : le N (phénylsulfoxy-5, benzimidazole) 2, carbamate de méthyle ou le Méthyl (5-phénylsulfinyl)-1H-benzimidazol-2-yl carbamate (Fig.4).

Il a été découvert en 1975 par Averkin *et al.* Il est très proche d'un point de vue structural du fenbendazole et du mébendazole (Delatour *et al.*, 1977). En effet, l'oxfendazole n'est autre, du point de vue structural, que le sulfoxyde de fenbendazole (Delatour *et al.*, 1983).

Contrairement aux deux benzimidazoles précédemment étudiés (parabendazole et cambendazole), l'oxfendazole est toujours commercialisé aujourd'hui et largement employé en France :

- chez les carnivores : Dolthène^{N.D.} ;
- chez les ruminants : Oxfénil 2.265%^{N.D.} ; Oxfénil 9.06%^{N.D.} ; Répidose Farmintic 5x1250^{N.D.} ; Répidose Farmintic 5x750^{N.D.} ; Répidose Farmintic 6x1250^{N.D.} ; Synanthic^{N.D.} ; Synanthic 9.06^{N.D.} ; Synanthic Répidose 5x750^{N.D.} ; Synanthic Répidose 5x1250^{N.D.} ; Synanthic Répidose 6x1250^{N.D.}.

L'oxfendazole s'utilise à 11,3 mg/kg pendant trois jours consécutifs chez les carnivores, à 4,5 mg/kg en prise unique chez les bovins et à 5 mg/kg en prise unique chez les ovins et caprins. Des dispositifs intraruminaux à libération séquentielle existent en France pour les bovins, ce sont des dispositifs permettant une absorption étalée dans le temps de l'oxfendazole (Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires, 2001). L'oxfendazole est, parmi tous les benzimidazoles, l'anthelminthique utilisé à la plus basse posologie.

Son spectre antiparasitaire est large :

- tous les nématodes ainsi que *Dypilidium caninum* et *Trichuris vulpis* chez le chien ;
- les strongles gastro-intestinaux et pulmonaires (œufs, larves, larves en hypobiose, adultes) des ruminants ;
- *Moniezia* spp des petits ruminants (l'activité contre ce cestode est inconstante chez les bovins (Delatour *et al.*, 1983)).

Comme l'ensemble des benzimidazoles, l'oxfendazole agit en bloquant la polymérisation de la tubuline en microtubules. Ceci a pour conséquence de paralyser la fonction de transport intracellulaire des cellules du parasite sensible. L'oxfendazole a une plus grande affinité pour la tubuline des parasites que pour celle des mammifères. Aussi, l'oxfendazole inhibe la fumarate réductase des parasites. Il bloque ainsi l'oxydation de la NADPH mitochondriale, privant le parasite d'énergie. Mais pour ceci, il faut une concentration en oxfendazole

supérieure à celle nécessaire à l'inhibition de polymérisation de la tubuline (McKellar *et al.*, 1990).

La toxicité générale de l'oxfendazole est très faible. La DL-50 est supérieure à 6400 mg/kg chez le rat et la souris, et à 1600 mg/kg chez le chien Beagle (Delatour *et al.*, 1977). Les doses létales pour les ruminants n'ont pu être établies car, compte tenu de la faible solubilité de l'oxfendazole, l'absorption était trop faible pour créer des effets toxiques (McKellar *et al.*, 1990).

L'embryotoxicité de l'oxfendazole est très controversée selon les publications. Elle existe pourtant, même si le mécanisme qui y conduit est moins évident que pour les deux benzimidazoles précédemment étudiés.

En 1976, Delatour et Richard étudient les propriétés embryotoxiques et antimitotiques de différents benzimidazoles (dont l'oxfendazole, le parabendazole et le cambendazole).

Chez le rat, l'oxfendazole, utilisé à 24,9 et 149,4 mg/kg, ne révèle aucune embryotoxicité. L'embryolétalité, le pourcentage d'anomalies externes observées et le poids des fœtus ne sont pas significativement différents des paramètres observés chez les témoins. Dans cette même expérience, le parabendazole et le cambendazole expriment, eux, une forte embryotoxicité. Les index mitotiques sur leucocytes humains et sur cellules KB ne sont pas significativement différents entre les témoins et les cultures mises en contact avec de l'oxfendazole. L'activité anticancéreuse, évaluée *in vivo* sur le carcinome ascitique d'Ehrlich de la souris, est nulle pour l'oxfendazole à 200 mg/kg/j en 2 fois et à 100 mg/kg/j malgré une bonne tolérance générale (Delatour *et al.*, 1976).

D'après cette expérience où l'oxfendazole est pourtant utilisé à très forte dose, ce composé n'est ni embryotoxique, ni antimitotique.

En 1977, Delatour *et al.* renouvelleront des expériences sur l'embryotoxicité de l'oxfendazole chez le rat et les ovins.

Chez le rat, l'oxfendazole se révèle alors embryolétal, tératogène et fœtotoxique. Cependant si le pouvoir embryolétal est relativement intense (29,7% d'embryolétalité à 15,75 mg/kg), il contraste avec une activité tératogène beaucoup plus discrète (7,1% de malformations externes à 15,75 mg/kg).

Chez la brebis, 7,5 mg/kg d'oxfendazole (soit 1,5 fois la dose thérapeutique) administré le 12^{ème}, le 17^{ème} ou le 23^{ème} jour de la gestation n'entraîne aucune embryotoxicité. Par contre, une dose 4,5 fois supérieure à la dose thérapeutique (22,5 mg/kg) est tératogène et embryolétale, mais uniquement à un stade bien défini du développement (le 17^{ème} jour). Cette même dose, administrée le 12^{ème} ou le 23^{ème} jour de la gestation, n'a aucun effet défavorable (Delatour *et al.*, 1977).

Dans une étude de Piercy *et al.*, 1979, rapportée par McKellar *et al.*, 1990, l'oxfendazole, administré à des brebis, en début de gestation, à trois fois la dose thérapeutique n'a pas eu d'effet tératogène (Piercy *et al.*, 1979).

En 1982, Delatour *et al.*, comparent l'embryotoxicité des métabolites de l'oxfendazole et concluent que seul le composé parental (soit l'oxfendazole) est responsable de manifestations embryotoxiques (Delatour *et al.*, 1982).

En conclusion, l'oxfendazole est bien doué de propriétés embryotoxiques par lui-même et non par un métabolite. Cependant ces propriétés sont moins exacerbées que pour le parabendazole et le cambendazole. Cet anthelminthique peut donc être utilisé lors de la gestation sous réserve du strict respect de la posologie recommandée par le fabricant (seule une contre-indication chez la chienne lors des 35 premiers jours de la gestation persiste). L'explication de ces manifestations tératogènes est plus délicate que pour le parabendazole et le cambendazole puisque l'oxfendazole ne semble pas doué de propriétés antimitotiques. Ceci tient sans doute au fait que l'oxfendazole a une affinité moindre pour la tubuline mammalienne que pour la

tubuline des parasites, d'où une difficulté de mise en évidence d'éventuelles propriétés antimitotiques.

4- L'albendazole.

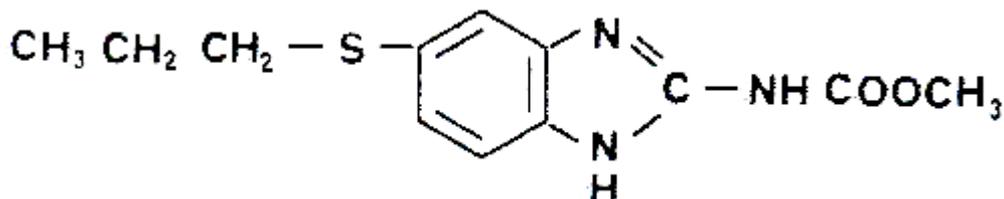


Figure 5 : Formule de l'albendazole (Marriner et al., 1980).

L'albendazole est un anthelminthique de la classe des benzimidazoles : le N (propylthio-5, benzimidazolyl) 2, carbamate de méthyle ou le méthyl [5-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate (Fig.5). Il a été découvert en 1976 par Theodorides *et al.* (Theodorides *et al.*, 1976a).

Cette molécule a une importance en médecine vétérinaire (c'est cette dernière que nous développerons le plus) mais aussi en médecine humaine. En effet, il existe, par exemple, relativement peu de composés capables de traiter les microsporodioses humaines (maladies dues à des sporozoaires tels *Encephalitozoon intestinalis* et *Vittaforma cornae*). Parmi les benzimidazoles testés *in vitro*, l'albendazole est le plus efficace sans révéler de toxicité pour les cellules hôtes (Didier *et al.*, 1998).

Egalement, depuis les dix dernières années, l'albendazole est le composé le plus largement utilisé dans le traitement médical de l'échinococcose humaine (Morris *et al.*, 1983 ; Horton, 1997). Perez-Serrano *et al.*, en 1997, ont montré l'efficacité de l'albendazole et de la bithérapie albendazole/sulfoxyde d'albendazole sur le développement larvaire d'*Echinococcus granulosus* (Perez-Serrano *et al.*, 1997).

En médecine vétérinaire, l'albendazole est commercialisé en France comme anthelminthique large spectre chez les ruminants sous différents noms déposés : Albendoral Bovin^{N.D.} ; Bilutac 30^{N.D.} ; Disthelm 2.5% Ovins-Caprins^{N.D.} ; Disthelm 7.5% Bovins^{N.D.} ; Médiamix V Disthelm Granulé Bovins-Ovins-Caprins^{N.D.} ; Rumifuge 7,5^{N.D.} ; Valbazen Bovins (5%)^{N.D.} ; Valbazen Dix^{N.D.} ; Valbazen Moutons et Chèvres^{N.D.} (D.M.V.2001).

La posologie recommandée chez les ruminants varie selon les spécialités ; de 2,5 mg/kg/j en dose filée pendant 3 jours à 15 mg/kg en prise unique.

Selon la posologie utilisée ; le spectre antiparasitaire est plus ou moins étendu.

L'efficacité de l'albendazole sur les différents parasites varie aussi énormément selon les expériences rapportées dans la littérature (Tabl.1).

Chez les bovins, par exemple, Theodorides *et al.* rapportent en 1976, 99% d'efficacité de l'albendazole à 2,5 mg/kg sur les larves L4 d'*Ostertagia ostertagi* (Theodorides *et al.*, 1976c); Williams *et al.* en 1977 rapportent 91,9% d'efficacité à 5 mg/kg sur les nématodes immatures de la caillette et 92,8% d'efficacité à 7,5 mg/kg sur les larves L4 d'*Ostertagia ostertagi* (Williams *et al.*, 1977a); et les mêmes auteurs en 1997 ne trouvent que 76,5% d'efficacité à 10 mg/kg sur les larves L4 d'*Ostertagia ostertagi* (Williams *et al.*, 1997).

Tableau 1 : Variation du pourcentage d'efficacité de l'albendazole sur les larves 4 d'*Ostertagia ostertagi* en fonction de la posologie et des publications.

Année	Expérimentateur	Pourcentage d'efficacité sur les larves L4 d' <i>Ostertagia ostertagi</i>	Posologie
1976	Theodorides <i>et al.</i>	99%	2,5 mg/kg
1977	Williams <i>et al.</i>	92,8%	7,5 mg/kg
1997	Williams <i>et al.</i>	76,5%	10 mg/kg

Les conditions d'expérience (Ross *et al.*, 1978), le type d'infestation utilisé (naturelle, monospécifique ou plurispécifique) (Theodorides *et al.*, 1976b ; Malone *et al.*, 1982 ; Kenneth *et al.*, 1982), le moment du traitement par rapport à l'infestation (Theodorides *et al.*, 1980 ; Knight *et al.*, 1977 ; Campbell *et al.*, 1979 ; Foreyt, 1988) et la méthode de comptage et de calcul utilisée (Herlich, 1977), font varier les pourcentages d'efficacité.

Pour simplifier, l'albendazole est actif sur les strongles digestifs et respiratoires des ruminants (adultes, formes larvaires en développement et enkystées, et œufs) ; sur les formes adultes et les formes immatures de plus de 6 semaines de *Fasciola hepatica* (à 10 mg/kg chez les bovins ; 7,5 mg/kg chez les ovins et caprins) ; sur *Moniezia* spp (scolex et segments) (à 7,5 mg/kg chez les bovins et 3,8 mg/kg chez les petits ruminants) et sur *Dicrocoelium linceolatum* (à 15 mg/kg chez les ovins).

Comme les benzimidazoles précédemment cités, l'albendazole agit en bloquant la polymérisation de la tubuline en microtubules ; mais, contrairement à l'oxfendazole, l'albendazole a une action inhibitrice sur la polymérisation de la tubuline identique pour les mammifères et les parasites (McKellar *et al.*, 1990). En effet, sur de la tubuline de cellule nerveuse de rat, l'albendazole entraîne une modification de la polymérisation à 2,4 g/kg avec une moindre incorporation de tyrosine dans le polymère (Solana *et al.*, 1997). Egalement, l'albendazole inhibe la fumarate réductase des parasites (McKellar *et al.*, 1990).

Les deux propriétés inhibitrices (polymérisation de la tubuline et enzymes du métabolisme parasite) sont certainement à l'origine de l'activité antiparasitaire de l'albendazole. Mais pour mieux cerner le mode d'action de l'albendazole et sa possible toxicité chez les mammifères, il faut tenir compte du métabolisme de cet anthelminthique. En effet, quel que soit le mécanisme d'action de l'albendazole (inhibition de la polymérisation de la tubuline ou inhibition de la fumarate réductase), il est nécessaire d'avoir un contact prolongé entre le parasite et l'anthelminthique (Heitz, 1988). De plus, maintenir une concentration en anthelminthique soutenue pendant longtemps est préférable à l'obtention d'un pic de concentration (Delatour *et al.*, 1990 ; Chartier *et al.*, 1996 ; Delatour *et al.*, 1987). En empruntant une notion propre aux antibiotiques, les benzimidazoles sont plus temps-dépendants que concentration-dépendants.

Chez les ruminants, l'albendazole n'est pas retrouvé en tant que tel dans le plasma (Marriner *et al.*, 1980 ; Prichard *et al.*, 1985). Après absorption dans le rumen pour les polygastriques et dans le duodénum pour les monogastriques (Florentin, 1986), il est rapidement transformé dans le foie en sulfoxyde d'albendazole et en sulfone d'albendazole. Ces deux métabolites subissent ensuite un trappage ionique vers la caillette dépendant du gradient de pH entre le sang et la caillette (Alvarez *et al.*, 1997b). Le sulfoxyde d'albendazole a une activité anthelminthique importante ; cette activité est beaucoup plus faible pour la sulfone d'albendazole (McKellar *et al.*, 1990).

L'efficacité de l'albendazole dépend donc de sa transformation en sulfoxyde et du passage du sulfoxyde dans la caillette.

Les capacités de transformation de l'albendazole des bovins et les caprins sont différentes de celles des ovins. Les bovins et les caprins oxydent plus vite l'albendazole en sulfone ;

l'efficacité est donc moindre dans ces espèces (Sanyal, 1997 a, b ; Prichard *et al.*, 1985). C'est pourquoi la posologie recommandée pour les bovins et les caprins est plus élevée que celle recommandée pour les ovins.

De plus le jeûne et/ou une forte charge parasitaire de la caillette modifient le gradient de pH sang/caillette. Ainsi le jeûne augmente l'efficacité de l'albendazole (Lifschitz *et al.*, 1997) tandis qu'une forte charge parasitaire réduit cette efficacité (Alvarez *et al.*, 1997a).

Ainsi, l'efficacité de l'albendazole ainsi que son mécanisme d'action dépendent de son métabolisme en sulfoxyde d'albendazole. L'importance de ce métabolite sera reprise lors de l'étude de l'embryotoxicité de l'albendazole.

La toxicité générale de l'albendazole est faible. La DL-50 par voie orale chez le rat est de 2400 mg/kg, comprise dans un intervalle de confiance à 95% entre 1550 et 3250 mg/kg (Theodorides *et al.*, 1976a). Martin en 1980 rapporte une dose maximale tolérée chez les ovins de 37,5 mg/kg (Martin, 1980). Cependant Knight *et al.*, 1977 n'observent aucun effet toxique de l'albendazole chez la brebis à 50 mg/kg et Theodorides *et al.*, 1976 n'en observent pas non plus à 100 mg/kg. Par contre une dose de 500 mg/kg n'est pas tolérée chez les ovins (Theodorides *et al.*, 1976a). Au cours des différentes expériences visant à définir le spectre de l'albendazole, les auteurs ont noté une absence de toxicité de l'albendazole :

- à 5 mg/kg chez les taurillons (Williams *et al.*, 1977b) ;
- à 7,5 mg/kg chez les taurillons (Williams *et al.*, 1977a) ;
- à 7,5 mg/kg chez les bovins adultes (Kenneth *et al.*, 1982) ;
- à 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 et 75 mg/kg chez les chevreaux âgés de 8 semaines (Foreyt, 1988) ;
- à 20 ; 30 ; 40 et 50 mg/kg chez les ovins (Knight *et al.*, 1977).

La dose maximale tolérée par les bovins est de 75 mg/kg (Martin, 1980).

Aucune toxicité de l'albendazole sur la fonction de reproduction n'est observée chez les taureaux (Berndtson *et al.*, 1980).

Chez les carnivores, où l'albendazole est parfois utilisé dans le traitement des giardioses, des doses de :

- 25 mg/kg par voie orale, deux fois par jour pendant 2 jours ;
- 30 mg/kg/j par voie orale pendant 3 semaines ;
- 5 mg/kg/j par voie orale pendant 26 semaines ;

n'entraînent aucun effet toxique chez le chien.

Par contre une toxicité sur la moelle osseuse (type aplasie médullaire entraînant anémie, leucopénie et thrombopénie) a été observée chez le chien pour des posologies de 30 et 60 mg/kg/j pendant 26 semaines, de 25 mg/kg par voie orale, deux fois par jour pendant 5 jours puis 50 mg/kg par voie orale deux fois par jour pendant 5 jours. Chez le chat, 100 mg/kg/j pendant 14 à 21 jours ou 50 mg/kg/j pendant 4 jours ont entraîné une toxicité sur la moelle osseuse (Stokol *et al.*, 1997). Dans chaque cas d'aplasie médullaire observé, des vomissements, de l'anorexie et de l'abattement accompagnaient les signes cliniques. Des doses ponctuelles plus fortes d'albendazole (250 mg/kg en prise unique) ont été testées chez le chien avec la même constatation de toxicité sur la moelle osseuse (anémie, leucopénie, thrombopénie et troubles gastro-intestinaux sévères) (Hallu *et al.*, 1997).

Dans les conditions habituelles de la thérapeutique, l'indice de sécurité de l'albendazole est élevé (Florentin, 1986).

L'embryotoxicité de l'albendazole existe et résulte des propriétés antimitotiques de l'albendazole lui-même ainsi que de son métabolite le sulfoxyde d'albendazole.

In vitro, l'albendazole et le sulfoxyde d'albendazole provoquent un blocage des mitoses de cellules embryonnaires du système nerveux central et de bourgeons de membres du rat (Whittaker *et al.*, 1991). Dans cette expérience, l'albendazole se montre 50 fois plus puissant que son métabolite le sulfoxyde d'albendazole.

Le pouvoir antimitotique est dû à une fixation sur la tubuline, inhibant sa polymérisation en microtubules et donc inhibant la formation du fuseau mitotique. En effet, 2,4 g/kg d'albendazole sur des cultures cellulaires de cerveau de rat entraîne une modification de la polymérisation de la tubuline avec moindre incorporation de tyrosine dans le polymère (Solana *et al.*, 1997).

Les cellules en division, et donc les embryons sont sensibles à la toxicité de l'albendazole et du sulfoxyde d'albendazole. L'embryon bovin perd ses capacités de division et présente des anomalies morphologiques lorsqu'il est mis en contact, *in vitro*, avec du sulfoxyde d'albendazole à la concentration de 1 µg/ml. Pour atteindre une telle concentration dans le fluide utérin, *in vivo*, il faudrait un traitement chez une vache gravide de l'ordre de 60 mg/kg d'albendazole soit environ 6 fois la dose thérapeutique (Piscopo *et al.*, 1997a).

Pour l'embryon de rat, *in vitro*, on observe une diminution de ses capacités de division à 500 ng/ml de sulfoxyde d'albendazole (Piscopo *et al.*, 1997b). *In vivo* chez la ratte traitée le 13^{ème} jour de gestation, l'albendazole est embryotoxique, embryolétal et tératogène. A 10 mg/kg on observe une augmentation du délai de développement des bourgeons de membre et 5% d'embryons malformés ; à 20 et 30 mg/kg, on observe plus de 20% d'anomalies externes sur les embryons ; on augmente également l'embryolétalité et l'embryotoxicité (déficit de croissance) si la dose augmente de 10 à 30 mg/kg (Mantovani *et al.*, 1995).

L'étude embryotoxique de dix métabolites de l'albendazole, du 8^{ème} au 15^{ème} jour de gestation chez la ratte, révèle que seuls l'albendazole et le sulfoxyde d'albendazole sont embryotoxiques. La dose maximale sans effet d'albendazole chez la ratte est de 6 mg/kg. L'administration de sulfoxyde d'albendazole et d'albendazole provoque le même type de malformations (Martin, 1980).

Cependant si, *in vitro*, l'albendazole est doué de propriétés embryotoxiques ; *in vivo*, seul le sulfoxyde d'albendazole est responsable de l'embryotoxicité. En effet, *in vivo*, l'albendazole est présent dans le plasma maternel à des concentrations trop faibles, voire nulles, pour atteindre le fœtus et exprimer son pouvoir embryotoxique. Dans le compartiment fœtal, l'albendazole n'est pas détectable alors que le sulfoxyde d'albendazole est présent à des concentrations nettement plus importantes que celles de sulfone d'albendazole (Florentin, 1986).

Divers essais utilisant un inhibiteur d'oxydation microsomale, le SKF-525-A, visant à inhiber la transformation de l'albendazole en sulfoxyde d'albendazole, ont été rapportés. Le but de ces essais était d'obtenir une concentration plasmatique élevée en albendazole lors de la gestation de la ratte afin de voir si l'albendazole passait la barrière placentaire et exprimait son pouvoir embryotoxique.

Dans un premier temps, ces essais se sont avérés concluants pour ceux qui croyaient à l'innocuité de l'albendazole (contrairement au sulfoxyde d'albendazole). En effet, l'administration conjointe d'albendazole et de SKF-525-A abolissait les effets toxiques de l'albendazole sur les embryons. Ainsi on concluait à l'absence d'embryotoxicité de l'albendazole par lui-même (Martin, 1980 ; Delatour *et al.*, 1981b ; Delatour *et al.*, 1984) ; résultats en contradiction totale avec les expériences menées *in vitro* par Whittaker *et al.*, 1991 et Solana *et al.*, 1997.

Mais le SKF-525-A diminue en fait la biodisponibilité plasmatique de l'albendazole et du sulfoxyde d'albendazole ; certainement par une inhibition de l'absorption de l'albendazole (Delatour *et al.*, 1984).

D'autre part, l'oxydation de l'atome de soufre de l'albendazole, auparavant attribuée au système monooxygénase cytochrome P450 dépendant, est en fait catalysée par un système monooxygénase Flavine Adénine Dinucléotide dépendant à localisation microsomale hépatique. Ce système ne peut pas être inhibé par le SKF-525-A (Fargetton *et al.*, 1986 ; Galtier *et al.*, 1986).

Donc l'abolition de l'embryotoxicité de l'albendazole observée en cas d'administration conjointe de SKF-525-A ne peut être une preuve de l'absence de toxicité de l'albendazole ; au lieu d'avoir une inhibition de la transformation d'albendazole en sulfoxyde permettant une

concentration élevée d'albendazole dans le sang ; on avait en fait une inhibition de l'absorption de l'albendazole.

L'albendazole et le sulfoxyde d'albendazole sont donc embryotoxiques. In vivo, du fait de la transformation intégrale d'albendazole en sulfoxyde d'albendazole, seul le sulfoxyde d'albendazole est responsable de l'embryotoxicité observée.

In vivo, chez les bovins, aucune embryotoxicité de l'albendazole à 25 mg/kg n'est observée lors d'administration au 21^{ème}, 31^{ème}, 41^{ème}, 51^{ème}, et 61^{ème} jour de gestation. La même dose administrée au 7^{ème} et/ou au 14^{ème} jour de gestation a entraîné des mortalités embryonnaires mais aucun effet tératogène. Administrée dans les trois derniers mois de gestation, la même dose ne provoque pas d'avortements. Des doses plus proches de la thérapeutique (10 et 15 mg/kg) n'entraînent aucun effet lors d'administration dans le premier tiers de la gestation (Theodorides *et al.*, 1993).

Chez les ovins, l'albendazole provoque des malformations chez les agneaux nés de mères traitées à des doses supra-thérapeutiques (Johns *et al.*, 1977).

L'albendazole est donc un membre de la famille des benzimidazoles des plus intéressants.

Utile en médecine humaine, il reste incontournable en médecine vétérinaire comme anthelminthique large spectre (pour sa valence contre la petite douve en particulier).

L'efficacité de cet anthelminthique, bien que variable selon les différentes publications, n'est plus à démontrer sur le terrain où il a fait et fait encore ses preuves.

L'albendazole est peu toxique ; aussi bien sur les animaux traités que sur leur progéniture.

Il faut dépasser les doses thérapeutiques pour étudier son pouvoir tératogène ; qui existe pour l'albendazole comme pour tous les benzimidazoles que nous avons succinctement présentés.

B- Le nétohimin, prodrogue de l'albendazole :

Nous attachons une importance particulière au nétohimin dans notre synthèse bibliographique pour deux raisons :

- nous avons choisi de décrire le nétohimin d'une part car c'est un probenzimidazole, une molécule génératrice de sulfoxyde d'albendazole (que nous avons étudié lors de nos expérimentations) ;

- d'autre part le nétohimin est à l'origine des travaux menés à Toulouse sur le sulfoxyde d'albendazole. En effet, en 1989, Fabre *et al.* rapportent une observation clinique démontrant le pouvoir embryotoxique du nétohimin. C'est à la suite de cette observation que la dynamique de recherche sur le sulfoxyde d'albendazole a été lancée à Toulouse.

Ainsi, s'il fallait décrire précisément un benzimidazole embryotoxique générateur de sulfoxyde d'albendazole, nous avons arbitrairement choisi le nétohimin plus que l'albendazole pour cette raison « historique ».

1- Caractères physiques et propriétés chimiques du nétohimin :

Le nétohimin fait partie de la famille des nitrophénylguanidines.

Le sel de sodium du nétohimin se présente sous forme d'une poudre jaune.

Le nétohimin est soluble dans l'eau, l'acétone, le méthanol, la diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde ; insoluble dans les autres solvants classiques et en particulier dans l'éther.

Le point de fusion de la molécule se situe à 160°C.

En solution dans le méthanol, le spectre U.V. présente deux optima à 225 et 347 nm.

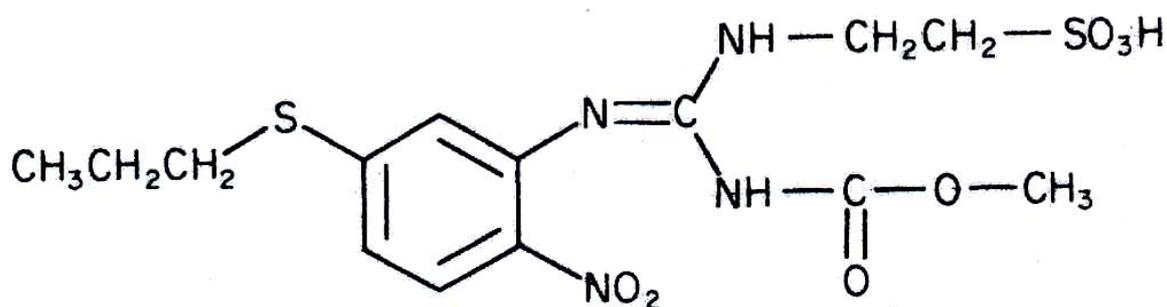


Figure 6 : Formule du nétobimin (Delatour et al., 1986).

Le nétobimin a pour formule brute : $C_{14}H_{20}N_4O_7S_2$ et pour poids moléculaire 421,2 D.

Il lui correspond plusieurs noms chimiques dans la pharmacopée :

- 2-[[[(Methoxycarbonyl)amino][[2-nitro-5-(propylthio)phenyl]amino]methylene] amino] ethane-sulfonic acid
- 2-[[[(Methoxycarbonyl)amino][[2-nitro-5-(propylthio)phenyl]imino]methyl]amino] ethane-sulfonic acid
- methyl[N' -[2-nitro-5-(propylthio)phenyl]-N-(2-sulfoethyl)amidino]carbamate
- N-methoxycarbonyl-N' -[2-nitro-5-(propylthio)phenyl]-N''-2-(ethylsulfonic acid) guanidine
- Acide[(méthoxycarbonyl amino)(nitro 2', n-propylthio 5' ph enylimino) méthyl amino 2]éthane sulfonique
- TOTABIN ; Sch 32481 (Fig.6).

Les proportions relatives des différents éléments sont : C : 39,9% ; H : 4,8% ; N : 13,3% ; O : 26,6% ; S : 15,4%.

Sa synthèse a été décrite par Nafissi-Varchei, 1983 :

Une solution équimolaire (1,08 moles) de taurine et de soude dans 270 ml d'eau est ajoutée à une solution de 0,54 moles de N-méthoxycarbonyl-N'-(2-nitro-4-propylthioph enyl)-S-méthyl dans 3900 ml de méthanol. Après agitation pendant cinq jours, la phase solide est récupérée par filtration.

Une deuxième phase solide est récoltée après passage d'azote gazeux sur le filtrat et une troisième après évaporation des solvants. Ces phases solides sont ensuite lavées dans du chloroforme chaud puis resolubilis ees dans du méthanol à ébullition. La filtration permet alors de recueillir 105 g de sel de sodium de nétobimin sous forme cristalline.

Le nétobimin sous forme acide est obtenu en préparant une solution de 7 mmoles de sel de sodium dissout dans 60 ml d'eau déionisée puis en ajoutant 8 ml d'une solution molaire d'acide chlorhydrique. Après agitation pendant une demi-heure à température ambiante, on récupère par filtration une phase solide qui correspond au composé (Nafissi-Varchei, 1983).

2- Métabolisme et pharmacocinétique du nétobimin :

Les benzimidazoles et les probenzimidazoles, dont le nétobimin, sont des anthelminthiques large spectre abondamment employ es en médecine humaine et vétérinaire. Le métabolisme et le comportement pharmacocinétique de ces xénobiotiques dans l'hôte peuvent affecter leur spectre d'activité ou leur toxicité.

En effet, l'efficacité antiparasitaire d'un anthelminthique benzimidazol e ne dépend pas exclusivement de son affinité pour la tubuline des parasites ; sa capacité à atteindre des concentrations élevées et soutenues dans le temps au site parasitaire est également à prendre

en compte ; l'efficacité dépend de la concentration toxique présentée au parasite pendant un temps suffisant pour causer d'irréversibles dommages.

Ainsi, le métabolisme du nétobimin est très important pour comprendre le spectre et la toxicité de ce probenzimidazole ; car par lui-même, il n'est ni antiparasitaire ni embryotoxique.

• **Principaux métabolites du nétobimin :**

Chez le rat quand on administre 44,2 mg/kg de nétobimin par voie orale pendant deux jours ; Talon et Delatour retrouvent cinq métabolites à cycle benzimidazole dans les urines (Delatour *et al.*, 1986 ; Talon, 1989) :

- l'albendazole (Fig.7),

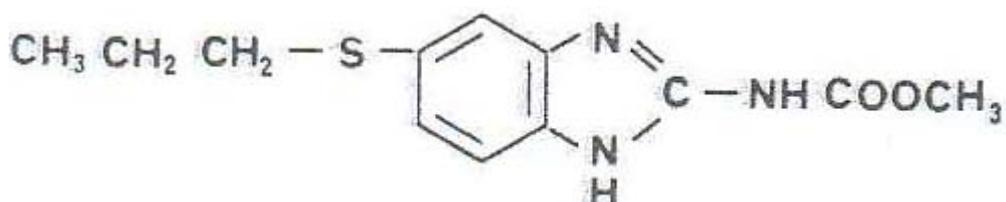


Figure 7 : Formule de l'albendazole (Marriner *et al.*, 1980).

- le sulfoxyde d'albendazole (Fig.8),

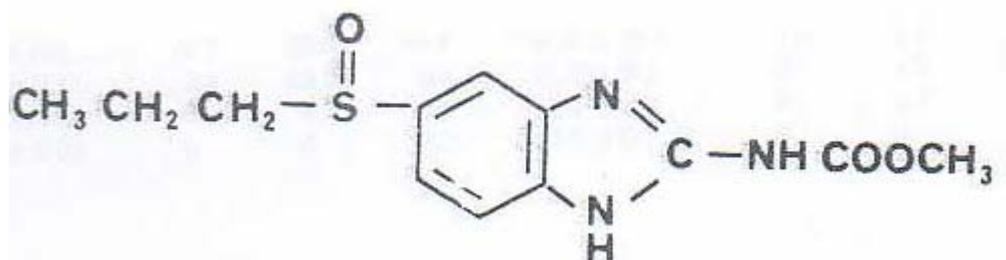


Figure 8 : Formule du sulfoxyde d'albendazole (Marriner *et al.*, 1980).

- la sulfone d'albendazole (Fig.9),

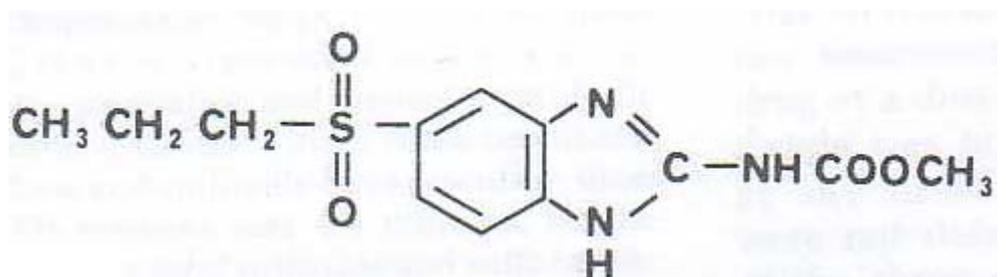


Figure 9 : Formule de la sulfone d'albendazole (Marriner *et al.*, 1980).

- le 5 propylsulfinyl-1H-benzimidazole-2-amine (Fig.10),

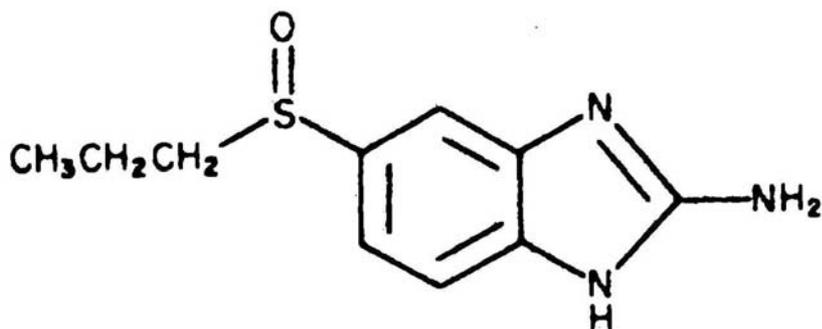


Figure 10 : Formule du 5 propylsulfinyl -1H-benzimidazole-2-amine (Delatour et al., 1986).

- et le 5 propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine (Fig.11).

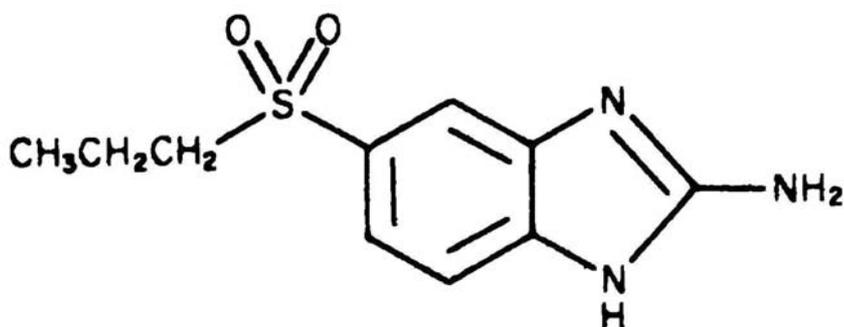


Figure 11 : Formule du 5 propylsulfonyl -1H-benzimidazole-2-amine (Delatour et al., 1986).

Delatour retrouve également certains de ces cinq métabolites dans l'urine, le plasma, le foie, le liquide ruminal des ovins ou le liquide caecal des rongeurs (Delatour *et al.*, 1986).

On comprend donc que le néobimin va subir dans l'organisme des biotransformations qui vont conduire à la formation de ces cinq métabolites.

Selon l'espèce animale considérée, la voie d'administration ou la posologie, le néobimin est, ou non, retrouvé dans le sang après son administration.

Chez les ovins :

- le néobimin n'est jamais retrouvé dans le sang :
 - après administration orale de 20 mg/kg de néobimin à des ovins (mâles ou femelles) (Cristofol *et al.*, 1998) ;
 - après administration orale de 20 mg/kg de néobimin à des brebis gravides en fin de gestation (Cristofol *et al.*, 1995) ;
 - après administration orale de 7,5 ; 20 et 50 mg/kg de néobimin (Merino *et al.*, 1997).
- le néobimin est retrouvé dans le sang :
 - après administration orale de 7,5 mg/kg d'une suspension de néobimin sous forme de zwitterion concentrée à 50 mg/ml ; en coadministration ou non avec une solution saline stérile de méthimazole concentrée à 25 mg/ml lors d'administration intramusculaire ou à 15 mg/ml lors d'administration orale, à

la posologie de 3 mg/kg. Cependant, seulement des traces de néobimin ont été irrégulièrement retrouvées dans les échantillons précoces plasmatiques (Lanusse *et al.*, 1992a).

Chez les bovins :

- le néobimin n'est jamais retrouvé dans le sang :
 - après administration orale de 20 mg/kg d'une suspension micronisée de néobimin sous forme de zwitterion (Lanusse *et al.*, 1993a).
- le néobimin est retrouvé dans le sang :
 - après administration sous-cutanée de 12,5 mg/kg de néobimin, il est détecté entre 0,25 et 12 heures après traitement (Lanusse *et al.*, 1990b).
 - après administration sous-cutanée de 12,5 mg/kg de néobimin sous forme d'une solution de sel trisaminé concentrée à 250 mg/ml (Lanusse *et al.*, 1992e).

Chez les caprins :

- le néobimin n'est jamais retrouvé dans le sang :
 - après administration orale de néobimin (Benchaoui *et al.*, 1993).

Chez le rat :

- le néobimin n'est jamais retrouvé dans le sang :
 - après administration de 59,5 mg/kg de néobimin (Cristofol *et al.*, 1997c).

Ainsi, le néobimin n'est jamais retrouvé dans le sang lorsqu'il est administré par voie orale sauf dans le cas d'une coadministration avec du méthimazole. Lorsqu'il est administré par voie sous-cutanée, le néobimin est retrouvé dans le sang d'une manière temporaire. Cependant, compte tenu de la rapide disparition de ce dernier à la fois dans le sang (dans les cas où l'on peut le détecter) et dans le tractus digestif, on peut en déduire que le néobimin est rapidement biotransformé (Lanusse *et al.*, 1993a).

Selon l'espèce animale considérée, la voie d'administration ou la posologie, l'albendazole est, ou non, retrouvé dans le sang après administration de néobimin.

Chez les ovins :

- l'albendazole n'est jamais retrouvé dans le sang :
 - après administration orale de néobimin (Delatour *et al.*, 1986) ;
 - après administration sous-cutanée de 20 mg/kg de néobimin (Lanusse *et al.*, 1990a) ;
 - après administration orale de 20 mg/kg de néobimin à des brebis gravides en fin de gestation (Cristofol *et al.*, 1995) ;
 - après administration orale de 20 mg/kg de néobimin à des ovins mâles ou femelles (Cristofol *et al.*, 1998) ;
 - après administration orale de 7,5 ; 20 ou 50 mg/kg de néobimin (Merino *et al.*, 1997) ;
 - après administration sous-cutanée de 20 mg/kg de néobimin sous forme de sel trisaminé en solution aqueuse concentrée à 250 mg/ml (Lanusse *et al.*, 1991a) ;
 - après administration sous-cutanée de 20 mg/kg de néobimin sous forme de sel trisaminé en solution aqueuse concentrée à 250 mg/ml en coadministration avec du méthimazole (concentré à 10 mg/ml) à la posologie de 1,5 mg/kg par voie intramusculaire ou du métyrapone (concentré à 150 mg/ml) à la posologie de 20 mg/kg par voie sous-cutanée ou de la quinine (sous forme de sulfate, en suspension dans du propylène glycol et une solution saline à 30/70) à la posologie de 30 mg/kg par voie intra-ruminale (Lanusse *et al.*, 1991a).

- l'albendazole est retrouvé dans le sang :
 - en faible concentration 30 minutes à 8 heures après administration intraruminale de 20 mg/kg de néobimin (Lanusse *et al.*, 1990a) ;
 - sous forme de traces irrégulières après administration orale de 7,5 mg/kg d'une suspension de néobimin sous forme de zwitterion concentrée à 50 mg/ml ; en coadministration ou non avec une solution saline stérile de méthimazole concentrée à 25 mg/ml lors d'administration intramusculaire ou à 15 mg/ml lors d'administration orale, à la posologie de 3 mg/kg (Lanusse *et al.*, 1992a).

Chez les bovins :

- l'albendazole n'est jamais retrouvé dans le sang :
 - après administration sous-cutanée de néobimin (Lanusse *et al.*, 1991b) ;
 - après administration orale de néobimin (Lanusse *et al.*, 1991b) ;
 - après administration orale de 20 mg/kg d'une suspension micronisée de néobimin sous forme de zwitterion (Lanusse *et al.*, 1993a) ;
 - après administration sous-cutanée de 12,5 mg/kg de néobimin sous forme d'une solution aqueuse de sel trisaminé concentrée à 250 mg/ml ou d'une suspension aqueuse de zwitterion concentrée à 417 mg/ml (Lanusse *et al.*, 1990b) ;
 - après administration sous-cutanée de 12,5 mg/kg de néobimin sous forme d'une solution de sel trisaminé concentrée à 250 mg/ml ou administration orale de 20 mg/kg de néobimin sous forme d'une solution de sel trisaminé concentrée à 50 mg/ml (Lanusse *et al.*, 1992e).

Chez les caprins :

- l'albendazole n'est jamais retrouvé dans le sang :
 - après administration orale de néobimin (Benchaoui *et al.*, 1993).

Chez le rat :

- l'albendazole n'est jamais retrouvé dans le sang :
 - après administration orale de néobimin (Delatour *et al.*, 1986).
- l'albendazole est retrouvé dans le sang :
 - dans les 6 heures après administration orale de 59,5 mg/kg de néobimin (Cristofol *et al.*, 1997c).

Ainsi, après administration de néobimin, on ne retrouve de l'albendazole dans le sang qu'en très faible quantité, ou pendant un temps très court, ou lors d'administration de fortes posologies de néobimin. Sinon, en principe l'albendazole n'est pas retrouvé dans le sang.

Chez les ovins, on a un métabolisme et des AUC voisins lors d'administration orale de néobimin à 8,4 mg/kg et d'albendazole à 5 mg/kg (Delatour *et al.*, 1986). Donc si ces administrations sont semblables sur le plan métabolique, le néobimin doit être biotransformé en albendazole. Le métabolisme du néobimin est donc comparable à celui de l'albendazole. D'ailleurs, après étude du comportement pharmacocinétique du néobimin et de ses métabolites ; à la fois après administration sous-cutanée à des bovins et après administration sous-cutanée et intra-ruminale à des ovins, on trouve que le sulfoxyde et la sulfone d'albendazole sont les principaux métabolites retrouvés dans le plasma après administration de néobimin (Lanusse *et al.*, 1991b) tout comme lors d'administration d'albendazole. Le sulfoxyde et la sulfone d'albendazole sont les principaux métabolites retrouvés dans le plasma après administration de néobimin et sont présent pendant 30 à 36 heures chez les bovins (Lanusse *et al.*, 1993a). Chez les ovins, le sulfoxyde d'albendazole atteint son maximum 11 heures après administration orale de néobimin (Cristofol *et al.*, 1995). La

sulfone d'albendazole atteint des concentrations beaucoup plus modestes que celles de sulfoxyde d'albendazole (Cristofol *et al.*, 1995).

Le 5-propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine et le 5-propylsulfinyl-1H-benzimidazole-2-amine sont des métabolites permettant en partie l'élimination du néobimim.

• Absorption et distribution du néobimim :

Le néobimim est très vite absorbé ; chez les ovins, le temps de demi-absorption (T_{1/2} abs) est de 0,45 +/- 0,21 heures après traitement intra-ruminal et de 0,36 +/- 0,11 heures après traitement sous-cutané (Lanusse *et al.*, 1990a). Ce temps correspond au temps nécessaire à la disparition de la moitié de la dose initiale de néobimim au site d'administration.

Par voie orale, le néobimim ne passe pas directement dans le sang ; il est métabolisé avant absorption. En effet, après réduction du groupe nitro du néobimim par la flore intestinale ou ruminale, et cyclisation en albendazole ; c'est l'albendazole qui est absorbé par la muqueuse ruminale ou intestinale et ensuite oxydé en sulfoxyde d'albendazole par le foie ; l'albendazole est aussi partiellement oxydé en sulfoxyde d'albendazole dans l'intestin et absorbé sous forme de sulfoxyde d'albendazole (Delatour *et al.*, 1986).

Utilisé par voie parentérale, le néobimim présente un métabolisme original : après le transport sanguin, il est sécrété dans le tube digestif où la flore réalise une réduction suivie d'une cyclisation en albendazole. L'albendazole est ensuite réabsorbé et oxydé en sulfoxyde et sulfone d'albendazole au niveau du foie ; une partie de la forme sulfoxyde est ensuite éliminée par voie biliaire (Talon, 1989).

Chez les ovins, après administration intra-ruminale de 7,5 mg/kg de néobimim, l'albendazole et le sulfoxyde d'albendazole sont retrouvés dans le rumen et absorbés à ce niveau. Le sulfoxyde d'albendazole et la sulfone d'albendazole sont ensuite sécrétés dans la caillette puis réabsorbés au niveau de l'intestin grêle (Talon, 1989). En effet, les métabolites sont échangés entre le sang et les différents fluides gastro-intestinaux par le biais d'un gradient de pH ; et donc, sont fortement concentrés dans la caillette (d'où une persistance des métabolites dans le tube digestif au-delà du temps de résidence moyen plasmatique). Il y a en effet un gradient de pH plus fort entre le sang et la caillette qu'entre le sang et le rumen ou l'iléon. Ce qui explique également que l'on trouve de plus fortes concentrations en sulfoxyde et sulfone d'albendazole dans la caillette que dans le sang ou les autres compartiments digestifs (rumen, iléon) (Lanusse *et al.*, 1993a).

La distribution du néobimim ou tout au moins de ses métabolites est large et dépend de l'espèce considérée.

Après administration orale d'albendazole, du sulfoxyde d'albendazole est retrouvé dans le liquide utérin (Piscopo *et al.*, 1997a). Après administration de néobimim, il en est de même. Les métabolites passent la barrière placentaire sans se fixer ou être transformés par les tissus embryonnaires chez les ovins. Les concentrations plasmatiques en sulfoxyde et sulfone d'albendazole sont en effet comparables entre les veines ovarique et jugulaire de brebis gravides en fin de gestation. Donc ces métabolites ne sont pas transformés lors du passage à travers le placenta (Cristofol *et al.*, 1995). Par contre chez le rat, la concentration en albendazole, sulfoxyde et sulfone d'albendazole dans le placenta et les tissus embryonnaires est plus élevée que celle retrouvée dans le sang maternel ; donc ces métabolites se fixent à des molécules dans les cellules embryonnaires et les tissus. La structure du placenta de la ratte semble plus perméable que celle du placenta de la brebis (Cristofol *et al.*, 1997c).

Le néobimmin est donc rapidement transformé puis absorbé et ce sont ses métabolites que l'on retrouve au niveau du tube digestif (site parasitaire) ou au niveau de la sphère génitale femelle (site embryotoxique).

• Biotransformations gastro-intestinales du néobimmin et de ses métabolites :

Lors d'administration de néobimmin, l'apparition d'albendazole, de sulfoxyde d'albendazole et de sulfone d'albendazole dans tous les compartiments gastro-intestinaux et de sulfoxyde et sulfone d'albendazole dans le sang est rapide ; ce qui semble indiquer que le néobimmin est rapidement converti en albendazole dans le tractus digestif (Lanusse *et al.*, 1993a ; Cristofol *et al.*, 1998).

Diverses expériences ont prouvé l'importance de la microflore pour la transformation du néobimmin en albendazole.

In vitro, lors de l'incubation de néobimmin avec du contenu ruminal ou caecal ; de l'albendazole et du sulfoxyde d'albendazole sont détectés (Delatour *et al.*, 1986 ; Talon, 1989).

Cependant, lorsque l'on fait bouillir le liquide ruminal ou iléal ; aucune activité métabolique n'est détectée ; le néobimmin ne subit aucune biotransformation (Lanusse *et al.*, 1992c).

Egalement, aucune conversion métabolique du néobimmin n'est observée après incubation avec du liquide abomasal ou des fluides gastro-intestinaux bouillis (Lanusse *et al.*, 1992b ; Virkel *et al.*, 1999 ; Virkel *et al.*, 1997).

In vivo, aucun métabolite portant un cycle benzimidazole n'est détecté lors d'administration de néobimmin à des rats « germ-free » (dépourvus de flore gastro-intestinale) alors que du sulfoxyde et de la sulfone d'albendazole sont retrouvés lors d'administration d'albendazole à ces mêmes rats (Delatour *et al.*, 1986 ; Talon, 1989).

Egalement in vivo, chez le rat, un pré-traitement à la gentamicine et à l'érythromycine entraîne une diminution de 85 à 90% des concentrations plasmatiques de sulfoxyde et sulfone d'albendazole (Delatour *et al.*, 1986 ; Talon, 1989).

Enfin in vitro, il a été démontré que le néobimmin n'est pas métabolisé par les enzymes microsomales bovines ou ovines. Ceci indique que la réduction et la cyclisation du néobimmin après administration orale ou parentérale doit se dérouler dans le tractus digestif (Lanusse *et al.*, 1993b).

Donc il semble que seule la flore gastro-intestinale soit capable d'assurer la formation d'un cycle benzimidazole à partir de néobimmin.

La flore agit par réduction du groupe nitro puis cyclisation en albendazole (Fig.12). Elle peut enfin réaliser une oxydation sur l'atome de soufre pour donner du sulfoxyde d'albendazole.

Selon les espèces, les capacités de biotransformation du néobimmin sont différentes. Chez les ovins, le rendement de biotransformation du néobimmin en albendazole est de 0,94. Chez le rat, l'AUC du sulfoxyde d'albendazole après administration de néobimmin est égale à 21% de l'AUC du sulfoxyde d'albendazole après administration d'albendazole donc le rendement de biotransformation du néobimmin en albendazole est moins bon que chez les ovins. Aussi chez le rat, le rendement lors d'administration de néobimmin est faible par rapport à une administration d'albendazole ; la concentration maximale (C_{max}), le temps pour atteindre cette concentration (T_{max}) et l'AUC du sulfoxyde d'albendazole sont meilleurs lors d'administration orale d'albendazole par rapport au néobimmin (Delatour *et al.* 1986 ; Talon, 1989).

Remarque : AUC = Aire Sous la Courbe (Area Under Curve). Ce paramètre estime la biodisponibilité d'une molécule en µg.h/ml. C'est l'intégrale de la courbe de concentration d'une molécule (dans le plasma ou un compartiment donné) en fonction du temps.

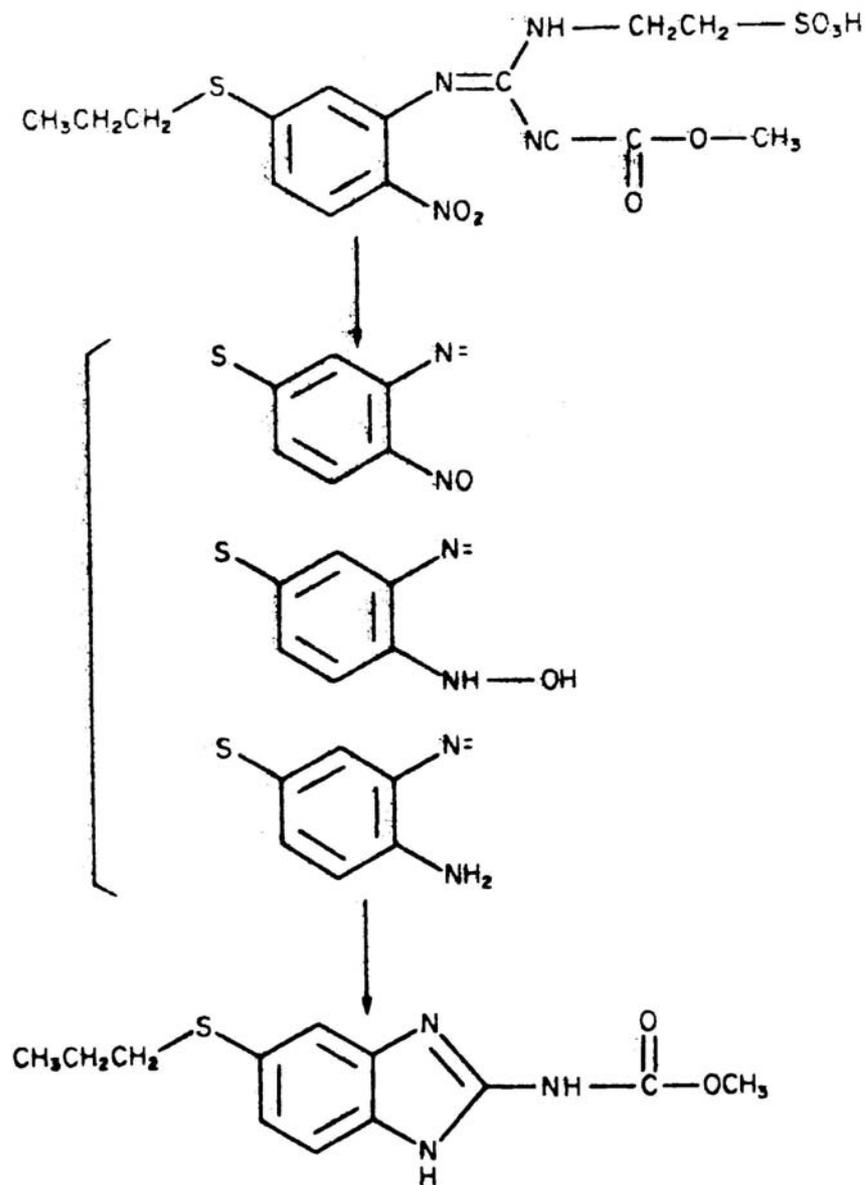


Figure 12 : Biotransformations du nétobimin en albendazole par la flore gastro-intestinale (Delatour *et al.*, 1986).

Une fois l'albendazole form e à partir du nétobimin, ce métabolite va également subir des biotransformations dans le tractus digestif.

Dans les microsomes des cellules intestinales, l'albendazole est oxydé en sulfoxyde d'albendazole, *in vitro*, chez le rat et les ovins. Cette sulfoxydation semble plus marquée chez le rat que chez les ovins. Chez l'agneau, cette sulfoxydation dans les microsomes intestinaux est moins marquée que la sulfoxydation dans les microsomes hépatiques (Redondo *et al.*, 1997).

L'oxydation de l'albendazole en sulfoxyde d'albendazole est aussi rencontrée *in vitro* lors d'incubation de l'albendazole avec du liquide ruminal ou iléal ovin ; elle n'a, par contre, pas lieu dans du liquide abomasal. La sulfoxydation est plus marquée lors d'incubation avec du liquide iléal que ruminal (Lanusse *et al.*, 1992c).

Donc l'oxydation de l'albendazole n'a pas uniquement lieu dans le foie mais aussi dans le tractus digestif. Ceci explique la détection rapide de sulfoxyde d'albendazole et de sulfone d'albendazole dans le tractus digestif et le plasma 15 à 20 minutes après administration orale de nétobimin chez les bovins (Lanusse *et al.*, 1992c)

Le sulfoxyde d'albendazole est aussi, *in vitro*, transformé lors d'incubation avec du liquide ruminal ou iléal d'ovins en sulfone d'albendazole mais de façon plus lente (Lanusse *et al.*, 1992c).

La sulfone d'albendazole n'est pas affectée par l'incubation avec les différents liquides gastro-intestinaux (Lanusse *et al.*, 1992c).

Le sulfoxyde d'albendazole peut être aussi réduit en albendazole ; plus efficacement par le fluide ruminal que le fluide iléal. Donc le sulfoxyde d'albendazole est une source d'albendazole dans le tube digestif. Ceci explique que l'on trouve de l'albendazole dans le tube digestif 72 heures après le traitement alors que l'on ne trouve plus de nétohimin 18 heures après le traitement (Lanusse *et al.*, 1993a).

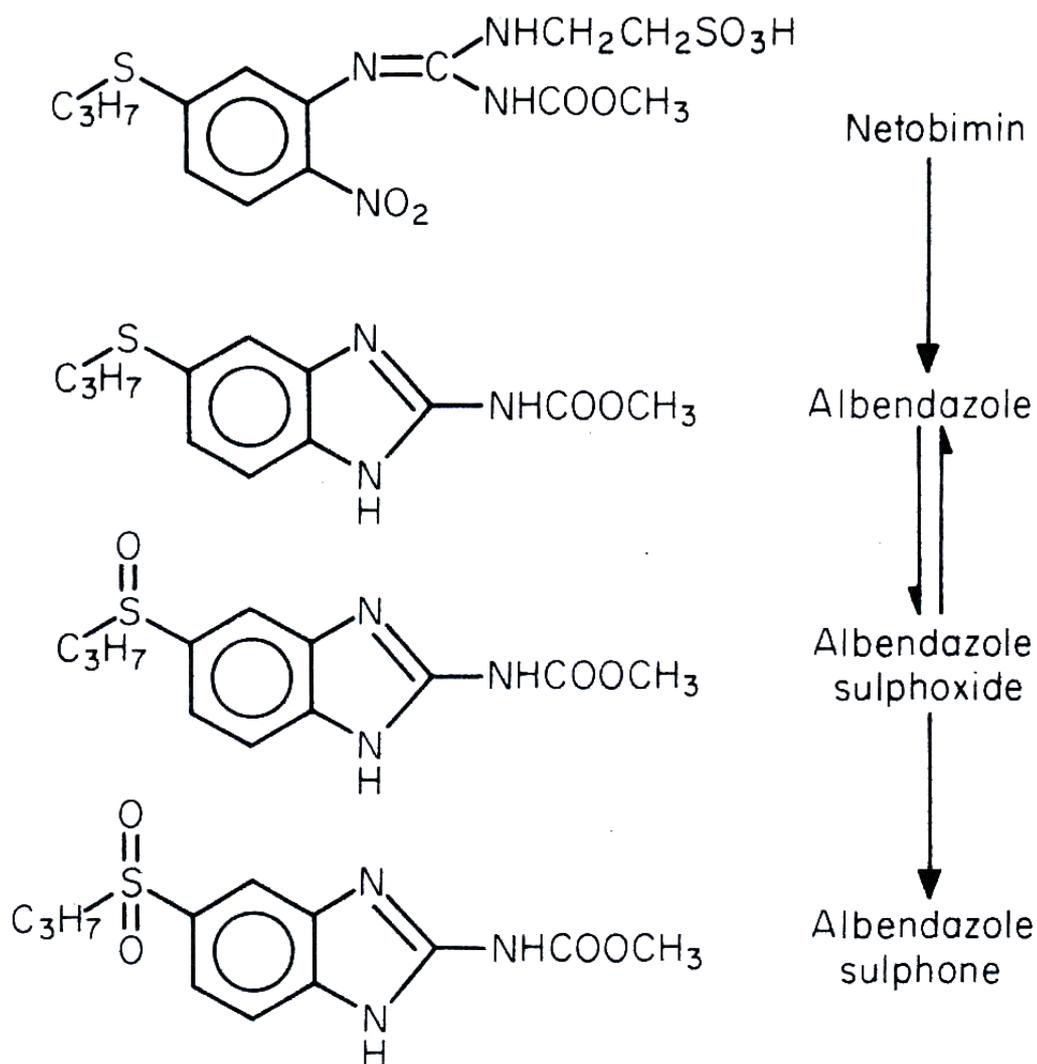


Figure 13 : Biotransformations gastro-intestinales du nétohimin (Lanusse *et al.*, 1990a).

Dans le tractus digestif, on assiste donc à la nitroréduction puis à la cyclisation du nétohimin en albendazole ; à l'oxydation de l'albendazole en sulfoxyde puis sulfone d'albendazole mais aussi à la réduction du sulfoxyde d'albendazole en albendazole (Fig.13).

• Biotransformations hépatiques des métabolites du nétopimin :

Lors de l'incubation *in vitro* du nétopimin avec des microsomes hépatiques de rat, aucun métabolite comportant un cycle benzimidazole n'est retrouvé. Par contre, lors de l'incubation d'albendazole avec des microsomes hépatiques de rat, on retrouve du sulfoxyde d'albendazole seul (Delatour *et al.*, 1986). De même l'incubation de sulfoxyde d'albendazole avec des microsomes hépatiques de rat permet l'obtention de la sulfone d'albendazole si le sulfoxyde est présent à forte concentration.

Donc l'oxydation en sulfoxyde puis en sulfone d'albendazole se déroule aussi dans le foie (Talon, 1989), à partir de l'albendazole formé dans le tractus digestif. Par contre, le foie ne peut transformer directement le nétopimin sans l'intervention préalable de la flore gastro-intestinale qui permet la formation d'albendazole à partir du nétopimin.

L'albendazole n'a jamais été détecté dans le sang après administration orale de nétopimin chez les bovins, ce qui suggère un fort taux d'oxydation de l'albendazole dans la fraction microsomale hépatique ou dans le tube digestif (Lanusse *et al.*, 1991b). Un effet de premier passage hépatique pourrait expliquer que l'albendazole n'est pas retrouvé dans le sang ; mais aussi, l'albendazole est oxydé dans le tractus digestif avant absorption ce qui explique la rapide apparition de sulfoxyde d'albendazole dans le sang et le tube digestif (Lanusse *et al.*, 1993a).

Cristofol *et al.* constatent également qu'après administration orale de nétopimin, on ne trouve dans le sang que du sulfoxyde et de la sulfone d'albendazole, ce qui suggère un fort effet de premier passage hépatique pour l'albendazole formé, qui à son tour est transformé en sulfoxyde puis sulfone d'albendazole (Cristofol *et al.*, 1998) dans le foie ou le tractus digestif.

Le métabolisme de l'albendazole est caractérisé par son oxydation en sulfoxyde puis en sulfone d'albendazole. Deux systèmes enzymatiques microsomaux différents sont responsables de l'oxydation séquentielle de l'albendazole ; un système monooxygénase FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) dépendant et un système dépendant du cytochrome P450 (Redondo *et al.*, 1997).

L'oxydation de l'albendazole en sulfoxyde d'albendazole est réalisée par une monooxygénase FAD dépendante tandis que l'oxydation du sulfoxyde en sulfone d'albendazole est réalisée par un système dépendant du cytochrome P450 (Lanusse *et al.*, 1991b).

Chez le rat et le mouton, l'oxydation de la fonction thioéther se produit aussi grâce à la monooxygénase flavine-adénine-dinucléotide-dépendante (FAD) des microsomes hépatiques (Fargetton *et al.*, 1986).

Chez les bovins, il existe une relation linéaire entre la concentration maximale de sulfoxyde d'albendazole et la posologie d'albendazole administrée (pour des concentrations allant de 15 à 120 mg/kg). Il n'y a donc pas de saturation des enzymes oxydatives qui convertissent l'albendazole en sulfoxyde d'albendazole (Piscopo *et al.*, 1997a).

La concentration en sulfone d'albendazole est maintenue dans l'organisme pendant une longue période (12 à 36 heures) et décline ensuite en même temps que l'élimination du sulfoxyde d'albendazole. Ceci confirme l'oxydation séquentielle de l'albendazole dans les microsomes hépatiques (Cristofol *et al.*, 1995), d'abord en sulfoxyde d'albendazole puis en sulfone d'albendazole. La sulfone d'albendazole a un Tmax retardé par rapport au Tmax du sulfoxyde d'albendazole ce qui est aussi en accord avec une oxydation séquentielle de l'albendazole en sulfoxyde d'albendazole puis en sulfone d'albendazole (Lanusse *et al.*, 1993a).

Seule une petite quantité de sulfone d'albendazole est produite lors de l'incubation d'albendazole et de microsomes hépatiques ovins. Donc, le foie oxyde lentement le sulfoxyde en sulfone d'albendazole (Delatour *et al.*, 1986 ; Lanusse *et al.*, 1991b).

Donc, deux systèmes enzymatiques distincts sont responsables de la biotransformation hépatique de l'albendazole.

L'oxydation de l'albendazole en sulfoxyde d'albendazole est une réaction réversible qui se produit grâce à la monooxygénase flavine-adénine-dinucléotide-dépendante des microsomes hépatiques.

La réaction, lente et irréversible, qui conduit du sulfoxyde à la sulfone d'albendazole fait intervenir une monooxygénase cytochrome P450 dépendante.

Ces différentes oxydations de l'albendazole conduisent à une considérable réduction en terme d'efficacité anthelminthique puisque l'albendazole est plus efficace contre les parasites que le sulfoxyde d'albendazole qui est lui-même plus efficace que la sulfone d'albendazole (Lanusse *et al.*, 1991a). Cela dit, ce chemin métabolique suivi par l'albendazole conduit aussi à une considérable réduction de la toxicité sur le développement puisque l'albendazole est un plus puissant inhibiteur des mitoses que le sulfoxyde ou la sulfone d'albendazole.

• **Élimination du néobimmin :**

Chez les ovins, après administration sous-cutanée de néobimmin, le néobimmin représente 94 à 97% des métabolites mesurés dans les urines sur 120 heures (Lanusse *et al.*, 1990a). Donc le néobimmin est en partie éliminé tel quel dans les urines. Mais aussi il est éliminé sous forme des cinq métabolites envisagés plus haut ; dans le lait, les fèces et l'urine.

Chez le mouton, 96 heures après administration de néobimmin marqué au C¹⁴, 52,3% de la radioactivité est retrouvée dans les fèces et 29,1% dans les urines (Talon, 1989).

Chez les ruminants (ovins, bovins, caprins) lorsque le néobimmin est administré par voie orale, on retrouve de l'albendazole, du sulfoxyde d'albendazole et de la sulfone d'albendazole dans le lait et les fèces (Talon, 1989). Le sulfoxyde et la sulfone d'albendazole pourraient être excrétés dans la bile et les urines (Delatour *et al.*, 1986). Les études réalisées sur l'albendazole chez les ovins, par fistulisation partielle du canal cholédoque montrent que 11% de la dose administrée passe par la bile ; pour moitié sous forme inchangée et pour moitié sous forme de sulfoxyde d'albendazole (la sulfone d'albendazole est retrouvée en très faible quantité) (Talon, 1989).

En plus de ces deux métabolites, des produits d'hydrolyse aminés sont excrétés dans les urines (Delatour *et al.*, 1986). En effet, chez les porcins, une quantité non négligeable de sulfone amine est retrouvée dans les urines (5-propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine) (Talon, 1989).

On ne sait pas où s'effectue l'hydrolyse des métabolites sulfone et sulfoxyde en amines correspondantes que l'on retrouve dans les urines (Talon, 1989). L'apparition de la sulfone amine suit le pic plasmatique de sulfone d'albendazole. L'hydrolyse du groupe méthylcarbamate de la sulfone d'albendazole, peut-être dans le foie, forme un métabolite aminé beaucoup plus polaire qui est probablement éliminé par la bile ou les urines ; il est détecté à haute concentration dans le tube digestif (Lanusse *et al.*, 1993a).

Les deux métabolites sulfoxyde et sulfone sont éliminés très lentement (des concentrations plasmatiques significatives sont maintenues pendant près de 36 heures) (Cristofol *et al.*, 1995) ; aussi le profil métabolique du sulfoxyde et de la sulfone d'albendazole dans le rumen, la caillette et l'iléon montre une phase effectivement lente d'élimination car ils sont présents jusqu'à 72 heures dans le tractus digestif après le traitement (Lanusse *et al.*, 1993a).

Après administration orale de néobimbin, du sulfoxyde et de la sulfone d'albendazole sont retrouvés dans le lait (Talon, 1989).

Après administration parentérale de néobimbin, du néobimbin, du sulfoxyde et de la sulfone d'albendazole sont retrouvés dans le lait (Talon, 1989).

Quelle que soit la voie d'administration, on ne détecte plus dans le lait

- de néobimbin 70 heures après administration,
- et de sulfoxyde et sulfone d'albendazole 55,5 heures après administration (Talon, 1989).

Donc le néobimbin est éliminé par différentes voies (fèces, lait, urine) sous différentes formes (néobimbin, albendazole, sulfoxyde et sulfone d'albendazole, 5-propylsulfonyl-1H-benzimidazole-2-amine, 5-propylsulfinyl-1H-benzimidazole-2-amine). L'élimination est lente ce qui permet de maintenir des concentrations en anthelminthique élevées et durables au site parasitaire.

• Facteurs influant sur la pharmacocinétique du néobimbin :

▪ Voie d'administration :

La présence d'un acide sulfonique dans la structure du néobimbin augmente son hydrosolubilité permettant ainsi des formulations par voie orale et parentérale (Lanusse *et al.*, 1991b).

Ces différences de voie d'administration ont été explorées et comparées.

Les différences d'efficacité *in vivo*, semblent s'expliquer par des différences de pharmacocinétique (McKellar *et al.*, 1990). Ainsi, la pharmacocinétique du néobimbin n'est pas la même lorsqu'il est administré dans le rumen ou dans la caillette. L'efficacité des benzimidazoles diminue s'ils sont administrés directement dans la caillette plutôt que dans le rumen (Kelly *et al.*, 1977). Donc, lors de la fermeture du sillon réticulaire, l'efficacité du néobimbin diminue.

Après administration par voie intraveineuse et intramusculaire, il a été mis en évidence la disparition rapide de la molécule initiale et l'apparition dans le plasma de sulfoxyde et de sulfone d'albendazole ; l'albendazole restant indétectable (Talon, 1989).

Les courbes de concentration plasmatique en fonction du temps du sulfoxyde d'albendazole, qui est le composé actif, montrent des concentrations maximales, des AUC, des durées de persistance réduites, que ce soit par rapport à une administration orale de néobimbin (à 8,4 mg/kg) ou d'albendazole (à 5 mg/kg). Ceci peut s'expliquer par une mauvaise résorption musculaire et/ou une mauvaise sécrétion dans le rumen du sel de sodium de néobimbin (Talon, 1989).

La plupart des paramètres qui caractérisent le profil pharmacocinétique du néobimbin lui-même ne sont pas statistiquement différents entre une administration sous-cutanée et intra-ruminale de 20 mg/kg de néobimbin chez les ovins (Lanusse *et al.*, 1990a).

Par contre, l'AUC du sulfoxyde d'albendazole obtenue après administration intra-ruminale de néobimbin est plus élevée que celle obtenue après injection sous-cutanée (94,92 +/- 30,21 µg.h/ml contre 3,24 +/- 0,22). La même conclusion existe en ce qui concerne la sulfone d'albendazole.

La pharmacocinétique du sulfoxyde d'albendazole et de la sulfone d'albendazole est différente lors d'administration sous-cutanée ou intra-ruminale (Lanusse *et al.*, 1990a).

Après administration intra-ruminale, il y a une meilleure conversion du néobimbin en albendazole et ses métabolites que lors d'administration sous-cutanée ; la conversion du néobimbin est moins bonne après administration parentérale (Lanusse *et al.*, 1990a).

Le néobimmin est moins efficace quand il est administré par voie sous-cutanée, on a en effet une meilleure conversion du néobimmin en albendazole après une administration orale par rapport à une administration sous-cutanée (McKellar *et al.*, 1991).

La voie d'administration affecte la cyclisation du néobimmin en albendazole, sa forme anthelminthique active, chez les bovins et les ovins ; le profil pharmacocinétique du sulfoxyde et de la sulfone d'albendazole, les principaux métabolites retrouvés dans le sang, sont plus bas lors d'une administration parentérale de néobimmin comparée à une administration orale.

Ces différences pharmacocinétiques reflètent d'ailleurs les différences observées en terme d'efficacité clinique (Lanusse *et al.*, 1991a).

L'apparition d'un niveau plasmatique décelable de sulfoxyde ou de sulfone d'albendazole est retardée lors d'une administration sous-cutanée de 12,5 mg/kg de néobimmin sous forme d'une solution de sel trisaminé concentrée à 250 mg/ml par rapport à une administration orale de 20 mg/kg de néobimmin sous forme d'une solution de sel trisaminé concentrée à 50 mg/ml.

Lors d'administration orale de néobimmin, les AUC du sulfoxyde et de la sulfone d'albendazole sont plus élevées que celles obtenues après administration sous-cutanée. De même, lors d'administration orale, le T1/2 d'élimination et le temps de résidence moyen sont plus longs pour ces deux métabolites.

On a une cyclisation du néobimmin en albendazole moins efficace lors d'administration sous-cutanée par rapport à une administration orale (Lanusse *et al.*, 1992d).

Ainsi la voie d'administration affecte la pharmacocinétique du néobimmin, ce qui se répercute sur son pouvoir antiparasitaire et embryotoxique. Du point de vue efficacité, la voie orale (même si elle est peu pratique dans certains cas) reste supérieure à la voie parentérale.

▪ Galénique :

Lors d'incubation avec du liquide gastro-intestinal, le néobimmin sous forme de suspension micronisée de zwitterion produit plus d'albendazole et de sulfoxyde d'albendazole qu'une solution de néobimmin sous forme de sel trisaminé (Lanusse *et al.*, 1992b). Donc, il n'y a pas que la voie d'administration qui affecte la pharmacocinétique du néobimmin, il y a aussi la galénique.

Il existe aussi une différence entre une suspension zwitterion et une solution de sel trisaminé (toutes les deux concentrées à 50 mg/ml) par voie orale chez les bovins (Lanusse *et al.*, 1991b):

- pour le sulfoxyde d'albendazole (Tabl.2) :

Tableau 2 : Différences pharmacocinétiques observées pour le sulfoxyde d'albendazole (AlbSO) en fonction de la forme galénique.

AlbSO	Suspension zwitterion	Solution de sel trisaminé
Cmax (µg/ml)	1,21	0,67
AUC (µg.h/ml)	18,55	8,57

- pour la sulfone d'albendazole (Tabl.3) :

Tableau 3 : Différences pharmacocinétiques observées pour la sulfone d'albendazole (AlbSO2) en fonction de la forme galénique.

AlbSO2	Suspension zwitterion	Solution de sel trisaminé
Cmax (µg/ml)	2,91	1,67
AUC (µg.h/ml)	51,67	22,77

La suspension micronisée de zwitterion de néobimbin a une biodisponibilité de 90 à 144% meilleure que la solution de sel trisaminé.

Ceci pourrait s'expliquer par :

- un pH beaucoup plus bas pour la suspension micronisée de zwitterion ce qui facilite la transformation bactérienne ;
- une différence de dissolution donc un ralentissement du passage du néobimbin pour la suspension d'où une meilleure réduction ruminale (Lanusse *et al.*, 1991b).

En comparant l'AUC du sulfoxyde d'albendazole dans diverses expériences de Lanusse chez les bovins, des variations du simple au double sont observées (Lanusse *et al.*, 1993a et Lanusse *et al.*, 1992c). Cependant dans l'expérience permettant l'obtention de la plus grande biodisponibilité, la suspension de néobimbin administrée par voie orale est plus concentrée ce qui permet des volumes administrés réduits. La fermeture du sillon réticulaire est ainsi évitée. Donc si une solution de néobimbin administrée par voie orale est concentrée, la biodisponibilité du sulfoxyde d'albendazole est meilleure.

Après administration sous-cutanée à des bovins de 12,5 mg/kg de néobimbin sous forme d'une solution aqueuse de sel trisaminé concentrée à 250 mg/ml ou d'une suspension aqueuse de zwitterion concentrée à 417 mg/ml ; la concentration maximale en néobimbin est plus élevée lors d'administration de la formulation trisaminée (2,2 µg/ml contre 1,37 µg/ml). Par contre, il n'y a pas de différence pour le néobimbin en ce qui concerne l'AUC et le T1/2 d'élimination entre les deux formulations.

L'apparition plus précoce de néobimbin et sa plus grande Cmax s'explique par la plus grande hydrosolubilité de la formulation trisaminée.

Il n'y a aucune différence entre les formulations en ce qui concerne les paramètres pharmacocinétiques du sulfoxyde d'albendazole sauf pour le Tmax qui est atteint beaucoup plus tôt pour la solution trisaminée.

Cependant les deux formulations sont globalement bioéquivalentes (Lanusse *et al.*, 1990b).

Donc, la galénique a une influence sur la pharmacocinétique du néobimbin. Lorsqu'il s'agit de présentations par voie orale, les suspensions sont à préférer aux solutions et la concentration de la suspension administrée par voie orale est importante et doit être élevée pour éviter une fermeture du sillon réticulaire.

▪ Différences interspécifiques :

La posologie du néobimbin est différente selon les espèces ce qui reflète des différences de pharmacocinétique. Cependant ces différences ne sont pas faciles à cerner car il s'agit de différences au niveau du métabolisme gastro-intestinal et hépatique en même temps.

Le temps de résidence plasmatique moyen du sulfoxyde d'albendazole est de 10 heures chez les bovins et de 15 heures chez les ovins (Lanusse *et al.*, 1991b).

Le rapport des AUC de la sulfone sur le sulfoxyde d'albendazole (rapport qui reflète les capacités hépatiques de sulfonation) est de l'ordre de 2,80 à 2,92 chez les bovins alors qu'il est de 0,35 chez les ovins. Ceci confirme un niveau de sulfonation hépatique plus élevé chez les bovins que chez les ovins (Lanusse *et al.*, 1991b). La conversion de sulfoxyde en sulfone d'albendazole chez les bovins est plus intense que chez les ovins (Lanusse *et al.*, 1990a).

Il semble donc que les bovins transforment et éliminent plus vite le néobimbin que les ovins.

Or, *in vitro*, la consommation de NADPH est plus élevée chez les ovins que chez les bovins après incubation des mêmes substrats avec les microsomes hépatiques. Ceci, et le fait que plus de sulfoxyde d'albendazole soit formé chez les ovins, semble indiquer que les ovins ont une

plus grande capacité d'oxydation de l'albendazole que les bovins (Lanusse *et al.*, 1993b). Le niveau de sulfoxydation de l'albendazole par les microsomes hépatiques du mouton est plus élevé que celui obtenu avec des microsomes bovins ; et il n'y a aucune différence dans la formation de sulfone d'albendazole entre les deux espèces (Lanusse *et al.*, 1992c). D'autre part, en utilisant la même dose de méthimazole (un inhibiteur des monooxygénases hépatiques) et la même voie d'administration, les modifications du comportement pharmacocinétique du nétohimin et de ses métabolites sont moins marquées chez les bovins que chez les ovins (Lanusse *et al.*, 1993b).

Malgré cette apparente contradiction dans les diverses expériences menées, une explication peut être trouvée au fait que le sulfoxyde d'albendazole est plus persistant chez les ovins que chez les bovins bien que les ovins oxydent plus rapidement l'albendazole dans leur foie.

En fait les différences entre les deux espèces seraient expliquées par des différences de métabolisme gastro-intestinal (Lanusse *et al.*, 1992c).

Les fluides ruminal et iléal bovins ont une plus grande capacité d'oxydation que ceux d'ovins (Lanusse *et al.*, 1992b). Ainsi, l'albendazole formé dans le tractus digestif est plus rapidement oxydé par les bovins. Les ovins ont aussi une capacité de réduction du sulfoxyde d'albendazole en albendazole par leur flore digestive plus élevée que les bovins (Lanusse *et al.*, 1992b). Ainsi le sulfoxyde est constamment une source d'albendazole qui à son tour sera oxydé en sulfoxyde d'albendazole dans le foie...

Retenons donc que le sulfoxyde d'albendazole persiste plus longtemps chez les ovins que chez les bovins ; c'est pourquoi une posologie plus élevée est nécessaire pour les bovins.

En ce qui concerne les caprins, le raisonnement est le même. Le rapport des AUC de la sulfone sur le sulfoxyde d'albendazole (rapport qui reflète les capacités hépatiques de sulfonation) est plus grand chez les caprins que chez les ovins (Benchaoui *et al.*, 1993). Le sulfoxyde d'albendazole persiste plus chez les ovins que chez les caprins donc il faut une posologie plus élevée pour ces derniers.

▪ Parasitisme et âge :

Le parasitisme abomasal (surtout avec *Ostertagia*) affecte le métabolisme et la pharmacocinétique de certains anthelminthiques : c'est le cas du fenbendazole et de l'albendazole car une augmentation du pH de la caillette est observé (Alvarez *et al.*, 1997b). Aussi, le parasitisme intestinal peut aussi faire varier la pharmacocinétique car il entraîne une variation de la vitesse du transit et une atrophie des villosités intestinales.

L'absorption des anthelminthiques pourrait être affectée par l'âge des animaux car le volume extracellulaire est plus grand chez le jeune ; car le jeune ruminant est un monogastrique ; car le pH urinaire plus bas chez les préruminants que chez les ruminants, car il y a plus facilement fermeture du sillon réticulaire et car il y a des différences de métabolisme hépatique (McKellar *et al.*, 1993 et 1995).

Cependant McKellar *et al.* n'observent pas de différence avec le parasitisme à *Nematodirus battus* et l'âge chez les agneaux (entre 3 et 9 mois). Cela dit, d'après les comptages d'œufs dans les fèces, il s'agissait d'une infestation moyenne (toujours < 300 opg) à *Nematodirus battus* or une infestation sévère correspond à 1000 à 2000 opg (œufs par gramme de fèces).

Dans une autre expérience, l'AUC du sulfoxyde d'albendazole est plus réduite chez l'agneau âgé d'un mois que chez l'agneau âgé de 8 mois après administration de 5 mg/kg de nétohimin. Ce qui veut dire que la conversion métabolique du nétohimin en albendazole et/ou en sulfoxyde d'albendazole est plus réduite pour les animaux les plus jeunes ce qui peut être dû à un rumen plus petit et moins fonctionnel (McKellar *et al.*, 1995).

Une autre étude montre que la cinétique plasmatique du nétohimin n'est pas significativement affectée par la présence d'une infestation modérée du nématode intestinal *Nematodirus battus* (McKellar *et al.*, 1991).

Malgré le manque d'informations concernant le nétohimin, nous sommes convaincus par ces trois expériences et celles réalisées sur le fenbendazole et l'albendazole que l'âge des animaux et le parasitisme peuvent affecter dans une certaine mesure la pharmacocinétique du nétohimin.

▪ Régime alimentaire :

Le nétohimin est transformé en albendazole par la flore digestive. Cette étape est capitale pour l'acquisition d'un pouvoir antiparasitaire. Egalement, l'albendazole subit des transformations dans le tractus gastro-intestinal par l'intermédiaire de la flore digestive.

Il est donc logique que le régime alimentaire, qui a des conséquences sur la composition de la flore et son importance numérique, influe sur la pharmacocinétique du nétohimin.

Deux types de régimes alimentaires ont été testés : un à base de foin de luzerne et un à base de concentrés. Une incubation de nétohimin ou de sulfoxyde d'albendazole a été réalisée dans les liquides ruminants issus des animaux nourris avec ces deux régimes alimentaires (Virkel *et al.*, 1997).

Une plus grande capacité de nitro et de sulforéduction est observée avec le liquide ruminal issu des ovins nourris avec un régime à base de concentrés (Virkel *et al.*, 1997).

En effet, la bioconversion du nétohimin en albendazole et sulfoxyde d'albendazole et du sulfoxyde d'albendazole en albendazole est plus intense lors d'un régime alimentaire à base de concentrés (Virkel *et al.*, 1999).

Le nétohimin sera donc plus efficace du point de vue antiparasitaire (mais aussi embryotoxique) si les animaux traités sont nourris avec un régime alimentaire incluant des concentrés.

▪ Gestation :

Beaucoup de changements physiologiques ont lieu durant la gestation. Des compartiments supplémentaires tels le placenta, les eaux fœtales et le fœtus peuvent influencer l'absorption, la distribution et la clairance des xénobiotiques. D'autre part, la sécrétion d'hormones telle la progestérone augmente durant la gestation et les hormones peuvent influencer certains mécanismes enzymatiques notamment dans le foie (Cristofol *et al.*, 1997b).

En comparant la pharmacocinétique du nétohimin chez des brebis non gravides ; gravides depuis 17 jours et depuis 4 mois ; aucune différence pharmacocinétique entre les trois groupes n'a pu être mise en évidence. Donc les métabolites du nétohimin ne subissent aucun changement pharmacocinétique ou métabolique durant la gestation chez les ovins (Cristofol *et al.*, 1997b).

Les concentrations plasmatiques en sulfoxyde et sulfone d'albendazole sont comparables entre les veines ovarique et jugulaire de brebis gravides en fin de gestation. Donc, en effet, ces métabolites ne sont pas transformés lors du passage à travers le placenta (Cristofol *et al.*, 1995).

Les concentrations en sulfoxyde et sulfone d'albendazole sont identiques dans la veine ombilicale, l'artère ombilicale, le liquide amniotique et le liquide allantoïdien. Ces concentrations sont égales à la moitié de la concentration en sulfoxyde et sulfone d'albendazole trouvée à la veine jugulaire de la brebis gravide. Ces deux métabolites traversent donc la barrière placentaire et atteignent des niveaux significatifs dans le fœtus (Cristofol *et al.*, 1995).

Il n'y a pas de différences statistiquement remarquables entre des brebis non gravides, des brebis en début de gestation et des brebis en fin de gestation en ce qui concerne la pharmacocinétique de l'albendazole. Ceci suggère que le sulfoxyde et la sulfone d'albendazole ne s'accumulent pas dans le placenta ou les tissus fœtaux et que le volume de distribution de ces métabolites est légèrement mais pas significativement modifié par la gestation (Cristofol *et al.*, 1994).

Egalement chez le rat, la pharmacocinétique et les niveaux plasmatiques des métabolites étudiés sont comparables chez les rattes gravides et non gravides donc le métabolisme et la pharmacocinétique du nétohimin ne sont pas affectés par les premiers stades de la gestation chez le rat (Cristofol *et al.*, 1997c).

▪ **Sexe :**

Des différences de pharmacocinétique entre mâle et femelle sont décrites pour certains xénobiotiques compte tenu de l'interaction des hormones sexuelles avec certains chemins métaboliques (Cristofol *et al.*, 1997a). En effet, des différences dans le comportement pharmacocinétique du piroxicam, de la flunarizine et de certains agents antidépresseurs ont été observées en comparant des animaux mâles et femelles. Chez l'Homme, différentes études montrent que les femmes traitées avec de l'acenocoumarol pour une thérapie anticoagulante nécessitent des doses plus élevées que les hommes (Arboix *et al.*, 1994).

Cristofol *et al.*, 1997a et 1998, ont comparé la pharmacocinétique du nétohimin et de ses métabolites entre des ovins mâles et femelles après administration orale de 20 mg/kg de nétohimin.

Les différences observées au cours de l'une de ces expériences sont représentées dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Différences pharmacocinétiques au niveau de la concentration maximale (Cmax), de l'aire sous la courbe (AUC), du temps de résidence plasmatique moyen (MRT) et du temps de demi-vie (T1/2) pour le sulfoxyde d'albendazole (AlbSO) et la sulfone d'albendazole (AlbSO2) selon le sexe.

AlbSO	MALE	FEMELLE	AlbSO2	MALE	FEMELLE
Cmax (µg/ml)			Cmax (µg/ml)	1.31	0.51
AUC (µg.h/ml)			AUC (µg.h/ml)	36.3	17.1
MRT (h)	13.7	16.8	MRT (h)	19.5	32.1
T1/2 (h)	5.9	10.6	T1/2 (h)	5.8	18.8

Le T1/2 (temps nécessaire à la disparition plasmatique de la moitié de la dose administrée ; ce temps matérialise les capacités d'élimination) et le MRT (temps de résidence plasmatique moyen) du sulfoxyde et de la sulfone d'albendazole sont plus élevés chez la femelle que chez le mâle. Donc le sulfoxyde et la sulfone d'albendazole séjournent plus longtemps dans le sang des femelles en raison d'un taux d'élimination plus faible chez ces dernières.

Pour la sulfone d'albendazole, la concentration plasmatique maximale et l'aire sous la courbe en fonction du temps sont plus faibles chez les femelles ; donc les femelles ont significativement moins de sulfone d'albendazole que les mâles (Cristofol *et al.*, 1998).

La testostérone est connue pour avoir une action inductive sur les microsomes hépatiques pour les xénobiotiques métabolisés par le cytochrome P450 (Cristofol *et al.*, 1997a). Il est en effet possible que la testostérone active l'oxydation du sulfoxyde en sulfone d'albendazole. Il est également possible que la testostérone inhibe l'hydroxylation de la sulfone d'albendazole

et donc ralentisse son élimination. L'augmentation des niveaux plasmatiques en sulfone d'albendazole chez le mâle peut être liée à une inhibition de son hydroxylation et une induction de sa formation par oxydation du sulfoxyde d'albendazole (Cristofol *et al.*, 1998).

Chez les ovins, la concentration en acides gras non estérifiés et en albumine est plus élevée chez le mâle que la femelle. Mais chez les mâles la fixation aux protéines plasmatiques est moins élevée que chez les femelles. Le sulfoxyde et la sulfone d'albendazole se fixent à l'albumine et aux globuline pour une très grande proportion et sans sélectivité ; mais en ce qui concerne la fixation aux protéines plasmatiques, il y a plus de différences entre mâles et femelles pour le sulfoxyde d'albendazole que pour la sulfone d'albendazole. D'un autre côté, la sulfone d'albendazole se fixe plus aux protéines plasmatiques que le sulfoxyde d'albendazole ce qui conduit à une fraction libre de sulfoxyde d'albendazole plus élevée que la fraction libre de sulfone d'albendazole et ceci beaucoup plus intensément chez le mâle que chez la femelle. Ainsi le sulfoxyde d'albendazole, beaucoup plus libre, est plus facilement métabolisé au niveau hépatique (Cristofol *et al.*, 1998).

Cependant il est possible que le métabolisme hépatique et gastro-intestinal masque certaines différences entre sexes (Cristofol *et al.*, 1998). Ce qui expliquerait que lors d'administration orale à des ovins de 7,5 mg/kg de sulfoxyde d'albendazole, on n'a pas de différence de cinétique entre les sexes pour le sulfoxyde et la sulfone d'albendazole (Capece *et al.*, 2000).

▪ Coadministration d'une autre molécule :

Certaines molécules sont connues pour inhiber ou induire des systèmes enzymatiques. Dans le cas du nétohimin, les monooxygénases hépatiques conduisant au sulfoxyde et à la sulfone d'albendazole peuvent être inhibées ou induites par d'autres molécules. Or l'induction (ou l'inhibition) d'isoenzymes du cytochrome P450 peut avoir de profonds effets sur le métabolisme et la toxicité des xénobiotiques (Fentem *et al.*, 1991). Egalement in vivo, la modulation des oxydations microsomales pourrait aboutir à un comportement pharmacocinétique modifié des métabolites du nétohimin ; ce qui pourrait influencer sur son efficacité clinique (Lanusse *et al.*, 1991a).

Nous verrons donc le cas de la coadministration avec du fenbendazole, du méthimazole, du métyrapone et de la quinine.

Il est connu que le fenbendazole est un inhibiteur de la sulfoxydation de l'albendazole in vitro.

Si on ajoute 375 μM de fenbendazole à 7,5 mg/kg de nétohimin lors d'administration orale à des ovins, on augmente l'AUC du sulfoxyde d'albendazole (33,74 $\mu\text{g.h/ml}$ sans fenbendazole contre 50,52 $\mu\text{g.h/ml}$ avec fenbendazole) ; de même on augmente le temps de résidence plasmatique moyen du sulfoxyde d'albendazole (MRT) de 21,76 à 34,93 heures et le temps de demi-élimination de 9,59 à 22,81 heures.

Pour des posologies de 20 et 50 mg/kg de nétohimin, les différences observées ne sont pas significatives (Merino *et al.*, 1997).

Ainsi, une coadministration de fenbendazole et de nétohimin semble tout à fait indiquée pour augmenter le pouvoir anthelminthique du nétohimin (par exemple en cas de résistance aux anthelminthiques ou pour éviter celles-ci).

Le méthimazole, une molécule antithyroïdienne, est le substrat de la monooxygénase flavine-adénine-dinucléotide-dépendante. La monooxygénase flavine-adénine-dinucléotide-dépendante transforme le méthimazole en molécules qui bloquent le cytochrome P450.

Le métyrapone, une molécule antistéroïdienne, est, *in vitro*, un inhibiteur des monooxygénases des microsomes hépatiques. C'est un inhibiteur du cytochrome P450 qui interagit donc avec la formation de la sulfone d'albendazole.

La quinine, une molécule utilisée contre la malaria, est, *in vitro*, une molécule qui diminue les oxydations microsomaux (Lanusse *et al.*, 1991a ; 1992e ; 1992d ; 1992a, 1993b).

Chez les ovins :

La coadministration de méthimazole (concentré à 10 mg/ml à la posologie de 1,5 mg/kg par voie intramusculaire), de métyrapone (concentré à 150 mg/ml à la posologie de 20 mg/kg par voie sous-cutanée) ou de quinine (sous forme de sulfate, en suspension dans du propylène glycol et une solution saline à 30/70 ; à la posologie de 30 mg/kg par voie intra-ruminale) n'affecte pas le comportement pharmacocinétique du néobimmin lui-même, lorsqu'il est administré à des ovins à la posologie de 20 mg/kg par voie sous-cutanée sous forme de sel trisaminé en solution aqueuse à 250 mg/ml.

En effet, une rapide absorption du néobimmin est observée (T_{max} précoce, T_{1/2} d'absorption court) ; ainsi qu'une rapide élimination (courts MRT et T_{1/2} élimination, basse AUC).

Par contre, lors de la coadministration de méthimazole ou de métyrapone, l'AUC du sulfoxyde d'albendazole et sa concentration plasmatique maximale (C_{max}) sont supérieures par rapport à l'administration de néobimmin seul.

Lors de la coadministration de métyrapone ou de quinine, l'AUC de la sulfone d'albendazole est inférieure par rapport à l'administration de néobimmin seul tandis que T_{max} est supérieur.

Différents mécanismes sont en jeu. Le méthimazole et l'albendazole sont en compétition pour la même enzyme, donc l'albendazole reste plus longtemps dans le tube digestif et donne lieu plus longtemps à la production de sulfoxyde d'albendazole dans le tube digestif. Il en résulte une augmentation de l'AUC du sulfoxyde d'albendazole.

Cette augmentation résulte aussi d'une inhibition du cytochrome P450 par les molécules formées par suite de l'action de la monooxygénase flavine-adénine-dinucléotide-dépendante sur le méthimazole. Enfin le sulfoxyde d'albendazole présent dans le tube digestif est réduit en albendazole qui sera à son tour source de sulfoxyde lors de l'oxydation hépatique...ceci contribuant aussi à augmenter l'AUC du sulfoxyde d'albendazole.

Le méthimazole, le métyrapone, et dans une moindre mesure la quinine inhibent les oxydations microsomaux hépatiques ce qui modifie *in vivo* la pharmacocinétique et la biodisponibilité des métabolites du néobimmin. Ceci semble très intéressant du point de vue efficacité antiparasitaire (Lanusse *et al.*, 1991a).

Dans une autre expérience sur les ovins, lors d'une injection intra-ruminale de néobimmin à 20 mg/kg et d'une administration intramusculaire de méthimazole à 1,5 mg/kg, Lanusse *et al.*, 1992d, observent :

- pour le sulfoxyde d'albendazole, une AUC 95% plus grande, un T_{1/2} élimination 390% plus long, un temps de résidence plasmatique moyen 252% plus long ;
- pour l'albendazole, une AUC 138% plus grande, un temps de résidence moyen 86% plus long ;
- et pour la sulfone d'albendazole, une augmentation du T_{1/2} élimination, de l'AUC et du temps de résidence plasmatique moyen (Lanusse *et al.*, 1992d).

Dans ce cas aussi, le méthimazole influence de façon bénéfique la pharmacocinétique du néobimmin et donc son efficacité.

Dans d'autres rapports sur les ovins, la présence de méthimazole par voie orale ou intramusculaire cause d'importants changements dans la pharmacocinétique du sulfoxyde

d'albendazole. L'élimination est plus lente et donc le temps de résidence plasmatique moyen et l'AUC sont plus grands. Le sulfoxyde d'albendazole est retrouvé dans le sang de 30 minutes à 60 heures après administration orale de 7,5 mg/kg de néobimin et à 72 heures dans le cas d'une coadministration de méthimazole.

Par contre, pour la sulfone d'albendazole, aucun changement n'est enregistré en présence de méthimazole sauf un délai d'apparition plus tardif.

Le temps de demi-vie d'élimination du sulfoxyde d'albendazole est augmenté de 58% lors d'administration intramusculaire de méthimazole et de 100% lors d'administration orale de méthimazole.

L'AUC du sulfoxyde d'albendazole est 55% plus élevée lors d'administration orale de méthimazole et 61% plus élevée lors d'administration par voie intramusculaire. Il semble donc que le méthimazole ralentit la transformation du sulfoxyde en sulfone d'albendazole. En effet, la biotransformation du méthimazole lui-même par la monooxygénase flavine-adénine-dinucléotide-dépendante produit des métabolites réactifs qui interfèrent avec le cytochrome P450 d'où un avantage du méthimazole en terme d'efficacité du néobimin (Lanusse *et al.*, 1992a).

Chez les bovins :

Chez les bovins, la biotransformation du méthimazole par la monooxygénase flavine-adénine-dinucléotide-dépendante donnerait aussi des métabolites actifs qui pourraient se fixer sur un site spécifique du cytochrome P450.

In vitro, le méthimazole inhibe la sulfoxydation de l'albendazole dans les microsomes hépatiques ovins et bovins.

Cependant, le méthimazole n'affecte pas significativement les paramètres pharmacocinétiques pour le néobimin ; seule sa concentration plasmatique maximale semble diminuée après administration conjointe de néobimin par voie sous-cutanée et de méthimazole. Par contre, la concentration plasmatique maximale du sulfoxyde d'albendazole est plus élevée sans méthimazole. Lors de coadministration de méthimazole, on a une plus longue T1/2 formation et T1/2 élimination et un plus long temps de résidence plasmatique moyen pour le sulfoxyde d'albendazole.

Pour la sulfone d'albendazole, aucune différence de pharmacocinétique n'est observée que ce soit après administration orale ou sous-cutanée (Lanusse *et al.*, 1992e).

La présence de méthimazole se traduit par une augmentation marquée de la biodisponibilité, de la demi-vie d'élimination et du temps de résidence du sulfoxyde d'albendazole.

Donc, en utilisant la même dose de méthimazole et la même voie d'administration, les modifications du comportement pharmacocinétique du néobimin et de ses métabolites sont moins marquées chez les bovins que chez les ovins.

Que ce soit dans le cas d'une coadministration avec du fenbendazole ; du méthimazole ; du métyrapone ou de la quinine, on voit que l'on peut modifier le comportement pharmacocinétique du néobimin. Cette modification va dans le sens d'une augmentation de la biodisponibilité du sulfoxyde d'albendazole, plus ou moins marquée selon les schémas posologiques employés. On peut donc théoriquement augmenter l'efficacité du néobimin avec de tels procédés. Ce genre de recherche prendra peut-être de plus en plus d'envergure si les résistances aux anthelminthiques continuent à se développer.

3- Spectre d'activité et mode d'action du néobimin :

Le néobimin n'est pas une molécule antiparasitaire ou embryotoxique en soi. Ce n'est pas une molécule en compétition, in vitro, avec la colchicine pour la fixation aux microtubulines de cerveau de veau, à la concentration de 0.001 M (Delatour *et al.*, 1986).

Le néobimin est une prodrogue qui, par l'intermédiaire de son métabolisme et de sa pharmacocinétique, acquiert ses propriétés antiparasitaires et par-là même toxiques. Or, plusieurs facteurs peuvent influencer la pharmacocinétique du néobimin. Ainsi, des variations en terme d'efficacité de la molécule existent dans la littérature. McKellar *et al.* affirmaient d'ailleurs que les différences d'efficacité in vivo, sont dues à des différences pharmacocinétiques (McKellar *et al.*, 1990).

D'autre part, la sensibilité des parasites évolue en fonction des pressions thérapeutiques, c'est un mécanisme d'adaptation propre à tous les êtres vivants. Ainsi, selon les souches de parasites utilisées lors des diverses expériences présentées dans la littérature, des variations en terme d'efficacité du néobimin seront mises en évidence.

En première approche, dans le Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires, le néobimin est présenté comme étant une substance dérivée de la nitrophénylguanidine, ayant un large spectre d'activité anthelminthique vis-à-vis des formes adultes, des larves, et des œufs des principaux strongles pulmonaires et gastro-intestinaux chez les bovins et les ovins, des formes adultes de la grande douve, des cestodes (scolex, anneaux et œufs) et de la petite douve chez les ovins.

Il est utilisé dans le traitement et la prévention des strongyloses gastro-intestinales, y compris l'ostertagiose due aux larves en hypobiose chez les bovins et les ovins.

A 7,5 mg/kg, il est indiqué contre les strongles gastro-intestinaux et pulmonaires ; à 10 mg/kg, contre les taenia en plus, et à 20 mg/kg, contre les grandes douves adultes et la petite douve ainsi que les larves de strongles en hypobiose (D.M.V.2001).

Chez les bovins :

Après administration orale de 7,5 mg/kg de néobimin, Talon observe une activité de 100% sur *Moniezia benedini*, cestode parasite de l'intestin grêle des ruminants (Talon, 1989). Yazwinski *et al.*, confortent ce résultat en 1992 (Yazwinski *et al.*, 1992).

Sur *Fasciola hepatica* adulte, l'action du néobimin est pratiquement nulle chez les animaux traités oralement à la dose de 7,5 mg/kg ; elle devient par contre élevée à 20 mg/kg. En effet une posologie de 20 mg/kg entraîne une réduction de 66,6% de *Fasciola hepatica* selon Talon (Talon, 1989). Mais le néobimin est actif seulement sur les formes adultes de *Fasciola hepatica* (McKellar *et al.*, 1990).

Une bonne efficacité est observée à partir de 15 mg/kg ; et à 20 mg/kg Talon observe une réduction de 82% de *Dicrocoelium dendriticum* (Talon, 1989).

L'activité globale du néobimin contre les strongles gastro-intestinaux est de 97% à 15 mg/kg et de 100% à 20 mg/kg (Talon, 1989).

Haemonchus placei, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi* et *Trichostrongylus axei*, parasites de la caillette, sont détruits à plus de 90% lors d'administration parentérale de 12,5 mg/kg de néobimin ou lors d'administration orale de 7,5 mg/kg de néobimin. Il faut pourtant une posologie de 20 mg/kg par voie orale pour atteindre, avec la même efficacité, les larves en hypobiose de *Ostertagia ostertagi*. Talon observe également une efficacité supérieure à 90% aux mêmes posologies sur les parasites de l'intestin grêle : *Nematodirus spp.*, *Cooperia spp.*, *Trichostrongylus colubriformis*.

Talon donne une efficacité de 100% vis-à-vis de *Ascaris vitulorum* à la dose orale de 7,5 mg/kg.

Bunostomum phlebotomum est aussi donné comme une espèce sensible (Talon, 1989).

Après infection expérimentale de bovins par *Cooperia*, *Ostertagia* et *Dictyocaulus viviparus*, divers traitements ont été testés par Downey:

- 1,5 mg/kg de néobimin dans l'eau de boisson, par jour pendant 7 jours,
- 2,8 mg/kg de néobimin dans l'eau de boisson, par jour pendant 7 jours,
- 1 mg/kg d'oxfendazole dans l'eau de boisson, par jour pendant 7 jours (pour comparaison avec un autre benzimidazole).

Le traitement à 1,5 mg/kg/j de néobimin réduit considérablement le nombre d'œufs par gramme de strongles digestifs retrouvés dans les fèces, mais moins que le traitement à 2,8 mg/kg/j de néobimin. Le traitement à 1 mg/kg/j d'oxfendazole est moins rapide mais à terme entraîne une meilleure efficacité antiparasitaire.

Les trois traitements sont efficaces sur *Dictyocaulus viviparus* mais pour le néobimin à 1,5 mg/kg/j on observe une résurgence des larves par gramme de fèces dès le treizième jour après traitement.

Après autopsie, on trouve une efficacité sur *Cooperia* et *Ostertagia* de 97,8% pour le néobimin à 1,5 mg/kg/j et de 99,9% pour le néobimin à 2,8 mg/kg/j et l'oxfendazole à 1 mg/kg/j.

Sur *Cooperia*, le néobimin à 1,5 mg/kg/j est actif à 50% ; le néobimin à 2,8 mg/kg/j est actif à 96,9% tandis que l'oxfendazole à 1 mg/kg/j est actif à 100% (Downey *et al.*, 1987).

Jacobs *et al.*, observent que sur des bovins infectés avec *Dictyocaulus viviparus*, le néobimin présente une meilleure efficacité lorsqu'il est administré à 2,8 mg/kg/j pendant 7 jours que lorsqu'il est administré en dose unique orale de 7,5 mg/kg (Jacobs *et al.*, 1988).

Plus optimistes, les résultats de Talon affirment que l'efficacité vis-à-vis de *Dictyocaulus viviparus* atteint près de 100% sur les larves et les formes adultes aux posologies de 7,5 mg/kg par voie orale et 12,5 mg/kg par voie parentérale (Talon, 1989).

A l'occasion de 4 études menées par Picard en 1991 (2 infestations naturelles et 2 infestations artificielles) le néobimin est apparu actif contre les principaux parasites gastro-intestinaux à des doses égales ou supérieures à 5 mg/kg.

Par comparaison avec des animaux témoins, le taux de réduction des vers adultes a été supérieur à 95,7% chez les moutons et 97,3% chez les bovins pour les parasites suivants :

Ostertagia ostertagi et *lyrata*
Haemonchus placei
Trichostrongylus axei et *colubriformis*
Cooperia spp.
Nematodirus helvetianus
Oesophagostomum radiatum
Bunostomum phlebotomum
Agriostomum wryburgi
Toxocara vitulorum et *Trichuris* spp.

A la dose de 5 mg/kg, Picard, 1991, a obtenu un taux de réduction de 96 à 100% sur *Dictyocaulus viviparus* adultes ; et à 7,5 et 10 mg/kg, on a aussi une activité sur les larves.

Aux doses de 5 et 10 mg/kg, le néobimin tue 99 à 100% des œufs et larves émis dans les fèces.

Par voie injectable, sous-cutanée, à la posologie de 12,5 mg/kg, chez les bovins, le néobimin possède une efficacité supérieure à 95% sur la majorité des strongles gastro-intestinaux et pulmonaires rencontrés dans cette espèce.

En ce qui concerne les strongles pulmonaires des bovins, le néobimin est actif à des doses supérieures ou égales à 5 mg/kg :

- sur les adultes de 96 à 100%
- sur les larves aussi ;
- sur les larves L1 émises dans les fèces de 99 à 100% (Picard, 1991).

Utilisé à 20 mg/kg, le nétobimin présente les pourcentages d'efficacité suivants selon Yazwinski *et al.*, 1992:

- 99,3% sur *Ostertagia spp*
- 99,4% sur *Ostertagia ostertagi*
- 99,9% sur *Ostertagia lyrata*
- 63,1% sur les larves 4 en développement de *Ostertagia spp*
- 0% sur les larves en hypobiose de *Ostertagia spp*
- 100% sur *Haemonchus placei*
- 100% sur *Trichostrongylus axei*
- > 99,9% sur *Cooperia spp*
- 100% sur *Cooperia oncophora*
- 100% sur *Cooperia surnabada*
- > 99,9% sur *Cooperia punctata*
- 100% sur les larves 4 de *Cooperia spp*
- > 99,9% sur *Nematodirus helvetianus*
- 99,4% sur les larves 4 de *Nematodirus spp*
- 100% sur *Bunostomum phlebotomum*
- 99,1% sur *Dictyocaulus viviparus*
- 98,9% sur *Oesophagostomum radiatum*
- 90,8% sur *Trichuris ovis* (Yazwinski *et al.*, 1992).

Notons l'efficacité pratiquement nulle sur les larves en hypobiose de *Ostertagia ostertagi* dans cette expérimentation malgré la posologie élevée à 20 mg/kg. Ce manque d'efficacité sur *Ostertagia ostertagi* est par ailleurs soulevé par Richards *et al.*, en 1987. Ces derniers affirment que chez les bovins, à 7,5 mg/kg, le nétobimin est efficace à 100% sur *Oesophagostomum radiatum*, à 97,66% sur *Cooperia spp*, à 100% sur *Nematodirus helvetianus*, mais n'est pas efficace contre les larves de *Ostertagia ostertagi*, et seulement efficace à 66,14% sur les adultes de *Ostertagia ostertagi* (Richards *et al.*, 1987c).

Selon Talon, à la posologie orale de 10 mg/kg, l'efficacité est de 100% sur *Oesophagostomum radiatum*, parasite du côlon et du caecum. Cette efficacité tombe environ à 85% pour *Trichuris spp.* à 7,5 mg/kg. Les trichures sont sans doute parmi les parasites les plus résistants à l'action du nétobimin (Talon, 1989).

Chez les bovins, l'activité du nétobimin n'est pas optimale contre la grande douve *Fasciola hepatica*, contre le strongle de la caillette *Ostertagia ostertagi* avec des variations selon les expérimentations, et contre les trichures.

Sur le plan tactique Talon affirme que deux traitements, 3 et 6 semaines après la mise au pré ne garantissent pas un taux d'infection suffisamment bas pendant toute la saison de pâture pour les adultes. Chez le veau, même si le nétobimin présente une activité marquée vis-à-vis de *Ostertagia* et de *Cooperia* à la dose de 7,5 mg/kg ; les mêmes observations que chez les adultes ont été faites quant à la pratique de deux traitements uniques, à la mise au pré (Talon, 1989).

Par ailleurs, l'utilisation du nétobimin dans l'eau de boisson pour le traitement des helminthoses gastro-intestinales donne de bons résultats (Talon, 1989 ; Downey *et al.*, 1987 ; Jacobs *et al.*, 1988). McKellar *et al.* confirment en effet que contrairement à la majorité des benzimidazoles, le nétobimin est très hydrosoluble ; lors de traitements dans l'eau de boisson, il a une efficacité respectable (McKellar *et al.*, 1990).

Enfin, il semble que l'efficacité du nétobimin lors de traitements oraux et à la posologie de 20 mg/kg soit un peu supérieure à celle de l'albendazole (utilisé à la dose recommandée par le laboratoire soit 10 mg/kg).

Par contre, l'efficacité par voie parentérale apparaît être assez nettement inférieure selon Talon (Talon, 1989). Ceci confirme ce qui a été exposé lors de l'étude du métabolisme du nétohimin suite à une administration parentérale.

Chez les ovins :

Concernant les cestodes, Talon observe à 10 mg/kg et à 15 mg/kg par voie orale, une activité élevée du nétohimin contre *Moniezia expansa* et à 20 mg/kg contre *Thysanosoma actinoïdes* (Talon, 1989). Bauer *et al.* confirment une efficacité de 100% sur les scolex de *Moniezia expansa* après administration de 20 mg/kg de nétohimin (Bauer *et al.*, 1990).

Concernant les trématodes, à 20 mg/kg par voie orale, Talon trouve une efficacité de 100% des formes adultes de *Fasciola hepatica* (Talon, 1989). Richards *et al.* confirment que chez les ovins, à 7,5 mg/kg, l'efficacité du nétohimin sur *Fasciola hepatica* n'est pas suffisante, il faut une posologie de 20 mg/kg pour réduire de 90,7% la population de ce parasite (Richards *et al.*, 1987b). Egalement Picard, 1991, constate que chez le mouton, on a les résultats suivants sur *Fasciola hepatica* (adultes) : 99% de réduction à 15 mg/kg et 100% de réduction à 20 mg/kg.

Sur *Dicrocoelium lanceolatum*, Picard trouve 98,9% de réduction à 20 mg/kg (Picard, 1991). Talon confirme que l'efficacité est de 91,9% à 15 mg/kg par voie orale vis-à-vis de *Dicrocoelium dendriticum* et de 99% à 20 mg/kg (Talon, 1989). Ce qui est en accord avec les résultats de Sanz *et al.*, sur des ovins infectés naturellement avec *Dicrocoelium dendriticum*, le nétohimin administré par voie orale à la posologie de 20 mg/kg réduit de 98,9% la charge parasitaire (Sanz *et al.*, 1987). Après administration orale de 15 mg/kg de nétohimin à des ovins infestés naturellement par *Dicrocoelium dendriticum*, Rojo-Vazquez *et al.* observent une réduction de 91,9% de la charge parasitaire. Ainsi le nétohimin est très utile dans la thérapie et le contrôle de la dicrocélie ovine (Rojo-Vazquez *et al.*, 1989).

En ce qui concerne les paramphistomes, le nétohimin est un peu décevant selon les travaux de Rolfe *et al.* Le nétohimin à 15 mg/kg par voie orale n'est pas efficace contre le paramphistome *Calicophoron calicophorum* chez les ovins. On observe seulement 46,2% d'efficacité ce qui n'est pas suffisant pour contrôler une infestation par ce parasite (Rolfe *et al.*, 1988).

L'efficacité globale du nétohimin contre les strongles gastro-intestinaux varie entre 93 et 100% selon Talon. Elle avoisine les 100% dès une posologie de 5 mg/kg par voie orale pour *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* (parasite de la caillette) et *Trichostrongylus colubriformis* (parasite de l'intestin grêle).

Pour une posologie de 7,5 mg/kg par voie orale, l'efficacité approche aussi 100% pour *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia davtiani* (parasites de la caillette) et pour *Nematodirus spp.*, *Cooperia spp.*, *Strongyloides papillosus* (parasites de l'intestin grêle).

D'autre part, la molécule a été testée sur des souches de *Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis* habituellement résistantes aux benzimidazoles. L'efficacité s'est révélée être de 98,6% sur le premier à la posologie de 20 mg/kg par voie orale et de 91,4% et 97,5% sur le second aux doses orales respectives de 15 et 20 mg/kg ; alors que pour les deux souches une administration de 44 mg/kg de thiabendazole est inefficace.

Enfin, *Oesophagostomum venulosum* est détruit à près de 100% à la posologie de 7,5 mg/kg par voie orale.

A 7,5 mg/kg par voie orale, l'efficacité du nétohimin varie de 97 à 100% vis-à-vis de *Dictyocaulus filaria*. Le laboratoire producteur de l'HapadexND indique également une activité de 100% sur *Protostrongylus rufescens* et *stilesi* et de 95 à 97,7% sur *Muellerius capillaris* à 7,5 mg/kg par voie orale (Talon, 1989).

Borgsteede *et al.*, ont testé l'efficacité du nétohimin chez des agneaux de 6 mois infestés artificiellement avec 10000 larves de *Haemonchus contortus* sensibles et résistantes au fenbendazole.

A la posologie de 7,5 mg/kg par voie orale, le nétohimin est efficace sur *Haemonchus contortus* sensible.

A la posologie de 20 mg/kg par voie orale, le nétohimin élimine 89,5% des *Haemonchus contortus* résistants ce qui n'est pas suffisant pour réduire le risque de sélection des résistances parmi les parasites (Borgsteede *et al.*, 1990).

D'autres travaux sur des souches résistantes ont été menées en 1992, au Brésil par Vieira *et al.*. Des ovins ayant subi deux traitements anthelminthiques à 15 jours d'intervalle (0,2 mg/kg d'ivermectine puis 20 mg/kg de nétohimin par voie orale dans les deux cas) ne présentent aucun signe de réduction du parasitisme (aucune diminution du nombre d'œufs par gramme de matière fécale). Les larves issues de ces animaux, appartenant principale à l'espèce *Haemonchus contortus*, ont été utilisées pour infecter des agneaux de 6 et 9 mois. Ces agneaux ont ensuite subi un traitement anthelminthique soit à base d'ivermectine (0,2 mg/kg par voie orale), soit de nétohimin (20 mg/kg par voie orale), soit de trichlorfon (100 mg/kg par voie orale) visant à évaluer l'efficacité de chacun des traitements sur la souche de *Haemonchus contortus* multirésistante.

L'ivermectine réduit de 19,4% les comptages d'œufs dans les matières fécales et réduit de 17,6% le nombre de parasites adultes, ce qui, en terme d'efficacité clinique correspond à une efficacité quasi-nulle sur cette souche multirésistante de *Haemonchus contortus*.

Le nétohimin réduit de 88,2% les comptages d'œufs dans les matières fécales et réduit de 38,9% le nombre de parasites adultes. La réduction des comptages d'œufs dans ce cas ne représente pas l'efficacité antiparasitaire du nétohimin ; elle indique seulement qu'en présence de nétohimin, les nématodes femelles arrêtent de pondre mais il n'y a pas destruction des parasites adultes.

Le trichlorfon réduit de 98,7% les comptages d'œufs dans les matières fécales et réduit de 99,9% le nombre de parasites adultes, c'est de loin l'antiparasitaire le plus efficace sur cette souche particulière de *Haemonchus contortus* (Vieira *et al.*, 1992). On voit dans ce cas que le nétohimin est bien loin des pourcentages d'efficacité annoncés dans les autres articles. Pour comparaison, sur une souche de parasites tout à fait différente, Bauer *et al.*, 1990, annoncent une efficacité beaucoup plus encourageante. Le nétohimin, administré par voie orale (sous forme de suspension ou de bolus) à la posologie de 20 mg/kg, est hautement efficace contre la plupart des nématodes gastro-intestinaux, y compris les larves en hypobiose chez les ovins.

Une efficacité de 100% (comparée à des témoins non traités) est observée sur :

Haemonchus contortus

Ostertagia spp

Trichostrongylus colubriformis

Cooperia curticei

Nematodirus spp

Strongyloides papillosus

Bunostomum trigonocephalum

Oesophagostomum venulosum

Chabertia ovina

les larves en hypobiose de l'intestin grêle.

Une efficacité de 99,9% est observée sur les larves en hypobiose de la caillette ; et de 85% sur *Trichuris ovis* et *Trichuris skrjabini* (Bauer *et al.*, 1990).

Sur d'autres souches résistantes de parasites, le néobimbin donne de bons résultats dans les expériences de Miller *et al.* sur une population de *Haemonchus contortus* résistante au lévamisole, 20 mg/kg de néobimbin donné par voie orale à des agneaux a entraîné une efficacité de 99,8%.

L'efficacité du néobimbin à 20 mg/kg par voie orale chez des agneaux est de 99,8% sur *Haemonchus contortus*, de 100% sur *Trichostrongylus colubriformis*, de 100% sur *Strongyloides papillosus*, de 100% sur *Nematodirus spathiger* et de 100% sur *Trichuris ovis* (Miller *et al.*, 1987).

Richards *et al.*, 1987, rapportent aussi des pourcentages d'activité très intéressants. A 7,5 mg/kg, par voie orale, le néobimbin réduit de 61,98% le comptage d'œufs par gramme chez des ovins naturellement infestés par des nématodes ; à 20 mg/kg, on trouve une réduction de 100%.

Le néobimbin est très efficace contre *Ostertagia circumcincta*, *Ostertagia trifurcata*, *Ostertagia ostertagi*; *Teladorsagia davtiani*; *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Nematodirus spathiger*, *Nematodirus filicollis*, *Nematodirus battus*, *Haemonchus contortus*, *Cooperia spp*, *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum venulosum*. La posologie la plus indiquée est celle à 20 mg/kg pour atteindre également les larves en hypobiose (Richards *et al.*, 1987a).

Finalement, en l'absence de résistance parasitaire, le néobimbin présente un spectre très intéressant chez les ovins, hormis les paramphistomes et les grandes douves immatures.

Chez les caprins :

Chez des chèvres laitières, croisées Alpine, de 4 ans en moyenne et pesant en moyenne 50 kg, trois types de traitements à base de néobimbin ont été testés en 1991 par Cabaret après une saison de pâture :

- un traitement unique à 20 mg/kg de néobimbin, par voie orale,
- un traitement sur deux jours consécutifs à 10 mg/kg, par voie orale,
- un traitement sur trois jours consécutifs à 7,5 mg/kg, par voie orale.

L'infestation parasitaire de ces chèvres est naturelle et plurispécifique. On trouve divers strongles tels *Trichostrongylus*, *Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Muellerius*, des cestodes tels *Cysticercus tenuicollis*...

Les nématodes *Trichostrongylus colubriformis* infectant ces chèvres sont résistants aux benzimidazoles.

L'efficacité du néobimbin sur *Muellerius capillaris* est bonne en particuliers pour les dosages sur deux jours ou trois jours consécutifs.

Par contre sur les strongles infestant ces chèvres, l'efficacité du néobimbin est moyenne, avec toutefois toujours un mieux lors d'administrations répétées sur plusieurs jours consécutifs (Cabaret, 1991).

Chez les caprins, l'utilisation du néobimbin devrait donc se faire de préférence sur plusieurs jours consécutifs.

Chez les mouflons :

Bien que non commercialisé pour cette espèce, le néobimbin donne de bons résultats dans les expériences de Meana *et al.*

Chez des mouflons (*Ovis musimon*), qui avant traitement présentent une infection à *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia circumcincta*, *Marshallagia spp.*, *Nematodirus spp.*, *Trichuris spp.*, *Capillaria spp.*, *Dictyocaulus filaria*, *Muellerius capillaris*, *Protostrongylus*

rufescens, *Cystocaulus ocreatus*, *Neostrongylus linearis*, Meana *et al.* observent après un traitement à 7,5 mg/kg de nétohimin par voie orale :

- 100% d'efficacité sur *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia circumcincta*, *Marshallagia spp.*, *Capillaria spp.* et *Dictyocaulus filaria* ;
- une très bonne efficacité sur *Nematodirus spp.* puisque seul un animal continue à excréter des œufs de ce parasite ;
- pas d'efficacité contre *Trichuris spp* et les protostrongles (sauf *Protostrongylus rufescens*);
- 93% d'efficacité sur *Protostrongylus rufescens* (Meana *et al.*, 1996).

Chez les porcins :

Bien que non commercialisé pour cette espèce en France, Talon rapporte une efficacité intéressante du nétohimin dans cette espèce.

Chez les porcins, l'action du nétohimin a été contrôlée par le biais d'un aliment supplémenté à 9 ppm donné pendant 56 jours. L'efficacité a été de 100% pour *Ascaris suum*, *Oesophagostomum dentatum* et *ouadrispinulatum* ainsi que pour *Strongyloïdes spp.* Il faut atteindre une concentration de 11,5 ppm pour détruire à 100% *Trichuris suis* (Talon, 1989).

Notons tout de même la lourdeur du traitement qui, malgré son efficacité, pourrait soulever quelques polémiques quant à sa durée.

Quelle que soit l'espèce considérée, le spectre du nétohimin est large sans toutefois être complet. L'absence d'activité contre les douves immatures, les paramphistomes et dans certaines expériences contre *Ostertagia ostertagi* l'empêche de représenter le seul et unique antiparasitaire à employer. Il faut bien sûr en matière d'antiparasitaire comme d'antibiotique, rester prudent quant à leur utilisation, et savoir composer au mieux avec toute la gamme dont dispose le praticien.

Il faut se méfier de l'apparition d'éventuelles résistances parmi certaines espèces de parasites comme *Ostertagia*, *Trichostrongylus* ou *Haemonchus*. Pour comprendre ces résistances, il faut comprendre le mode d'action de l'antiparasitaire...or dans le cas des benzimidazoles ce mode d'action n'est pas encore complètement élucidé. Diverses théories sont présentées dans la littérature sans qu'aucune d'entre elle ne soit admise comme étant celle qui expliquerait à elle seule le spectre et le mode d'action du nétohimin et des benzimidazoles.

Pourtant les travaux de Prichard (Prichard, 1973) sur la fumarate réductase d'*Haemonchus contortus* ont permis de montrer que les benzimidazoles inhibent le transfert d'électrons normalement présent lors de la transformation du fumarate en succinate.

Le métabolisme énergétique des helminthes est en effet différent de celui des mammifères : le phospho-énol-pyruvate donne chez les premiers du malate et chez les seconds du pyruvate. Par la suite, l'A.T.P. nécessaire à la survie des parasites, est produit lors d'une suite de réactions anaérobies parmi lesquelles la transformation du fumarate en succinate est la plus importante. La fumarate réductase N.A.D.P.H. dépendante, inhibée par les benzimidazoles, joue ainsi un rôle capital dans la formation d'énergie chez le parasite, alors qu'elle n'intervient que très peu chez l'hôte (Fig.14).

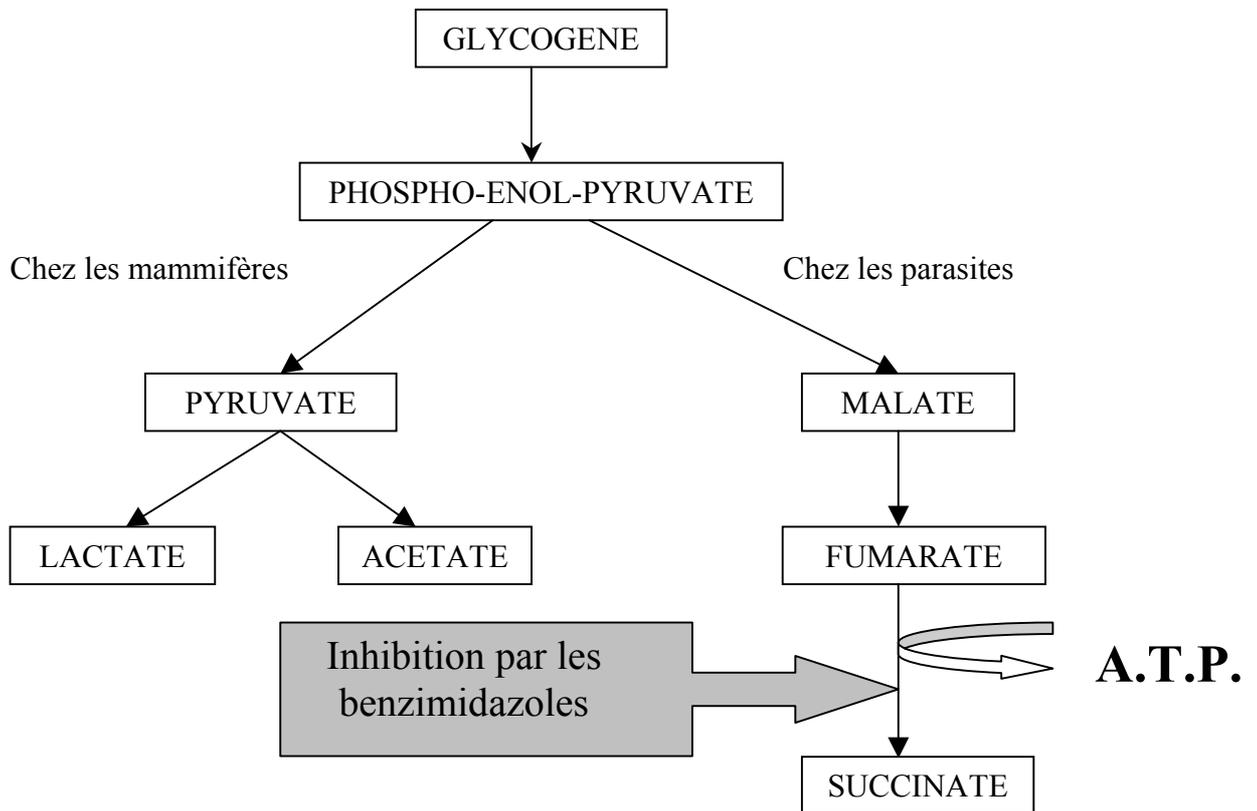


Figure 14: Activité comparée des enzymes du métabolisme énergétique chez l'hôte et le parasite d'après Talon, 1989.

Ainsi selon Talon, 1989, les benzimidazoles interfèrent avec le métabolisme énergétique des parasites et en particuliers avec la fumarate réductase. McKellar *et al.*, 1990 affirment que le groupe carbamate est essentiel pour affecter l'utilisation du glycogène par les nématodes et nuance donc le mode d'action des benzimidazoles en invoquant des enzymes différentes de celles citées par Talon, 1989. Selon eux, en effet, l'albendazole inhibe la malate déshydrogénase de *Ascaris suum*, *Fasciola hepatica*, *Moniezia expansa*, *Ascaris galli*, *Heterakis gallinae* tandis qu'à la fois l'albendazole, le sulfoxyde et la sulfone d'albendazole inhibent la fumarate réductase d'*Ascaris suum*. McKellar *et al.*, 1990, nuance encore plus ce mode d'action des benzimidazoles en ajoutant qu'il faut cependant des concentrations en benzimidazole supérieures pour inhiber les enzymes que pour inhiber la polymérisation de la tubuline (McKellar *et al.*, 1990).

Ainsi, une autre hypothèse quant au mode d'action des benzimidazoles carbamates concerne leur interaction avec les microtubulines ; en se fixant sur ces molécules, les benzimidazoles carbamates inhibent leur polymérisation en microtubules.

La fixation se fait selon Talon, 1989, sur les sites d'action de la colchicine de manière réversible. On peut ainsi définir une constante d'inhibition de la fixation de la colchicine. Cette constante est spécifique d'une molécule de benzimidazole carbamate envers la microtubuline d'une espèce de parasite.

Chez les helminthes, les benzimidazoles inhibent en particulier la synthèse des microtubules des cellules intestinales qui jouent un rôle fondamental dans la fonction d'absorption du glucose. Enfin les benzimidazoles carbamates présentent une affinité inférieure pour la microtubuline des mammifères que pour celle des helminthes. Pourtant, l'activité embryotoxique de certaines molécules du groupe s'explique aussi par ce pouvoir de fixation, associé à une rémanence élevée (Talon, 1989).

Lubega *et al.*, 1991, confirment que les benzimidazoles sont connus pour inhiber la polymérisation de la tubuline en microtubules chez les mammifères, les champignons et les

helminthes. Ils se fixent sur la tubuline des nématodes avec une haute affinité. Leurs résultats montrent que les benzimidazoles se fixent sur la tubuline de *Haemonchus contortus*.

Lors de résistance par les parasites, on a alors une baisse de l'affinité des benzimidazoles pour la tubuline des parasites et un changement de conformation de la β -tubuline des parasites. D'autre part, les œufs des parasites sont plus sensibles aux benzimidazoles que les larves qui sont elles-mêmes plus sensibles que les parasites adultes (Lubega *et al.*, 1991). Selon McKellar *et al.*, en effet, l'inhibition de la polymérisation de la tubuline est le mode d'action des benzimidazoles quand il s'agit d'une activité ovicide (McKellar *et al.*, 1990).

L'inhibition de la polymérisation de la tubuline peut ne pas être, en soi, létale immédiatement après exposition aux benzimidazoles. Il faut donc un temps suffisant pendant lequel le benzimidazole est au contact du parasite pour le détruire (Lubega *et al.*, 1991). Dans la classe des benzimidazoles, les plus efficaces sont ceux qui sont absorbés et éliminés lentement (McKellar *et al.*, 1990). Cette affirmation de McKellar *et al.* résume toute l'importance de la pharmacocinétique sur l'efficacité antiparasitaire.

Finalement les deux modes d'action des benzimidazoles vont dans le même sens en perturbant le métabolisme énergétique des helminthes. On comprend alors mieux comment la persistance des benzimidazoles conditionne leur activité ; en présence de ces molécules, les parasites s'adaptent en réduisant leurs dépenses énergétiques et en bloquant tout particulièrement la production d'œufs. Ils doivent ensuite utiliser leurs réserves ; celles-ci épuisées, les parasites meurent (Talon, 1989).

Le spectre d'activité du nétopimin ne se limite pas aux strongles, cestodes et trématodes affectant nos animaux de rente. Le nétopimin, comme l'albendazole, fait l'objet de recherche dans le domaine du traitement de l'échinococcose humaine. En Espagne, l'équipe de Garcia-Llamazares étudie d'ailleurs le rôle de la coadministration de fenbendazole au nétopimin afin d'obtenir une meilleure régression des kystes hydatiques (Garcia-Llamazares *et al.*, 1998 et 1997).

4- Toxicité du nétopimin :

Peu d'études ont été publiées quant à la toxicité du nétopimin en lui-même, la toxicité de ses métabolites est mieux connue. En effet étant donné que le nétopimin est transformé en albendazole par la flore ruminale ou intestinale, la même toxicité pour le nétopimin que pour l'albendazole peut être attendue. Le nétopimin n'a aucune affinité pour la fixation à la tubuline de mammifère (Delatour *et al.*, 1986). Donc, à priori, le nétopimin n'est pas tératogène en lui-même mais par l'intermédiaire de ses métabolites. Cependant même si sa toxicité dépend de celle de ses métabolites, nous illustrerons cette partie sur la toxicité du nétopimin avec des expériences faites avec le nétopimin ; non avec l'albendazole. Nous verrons donc la toxicité aiguë du nétopimin, sa toxicité subchronique, ses effets mutagènes, sur l'opérateur ou l'environnement et pour finir par sa toxicité sur le développement embryonnaire.

▪ Toxicité aiguë du nétopimin :

L'administration orale de 150 mg/kg de nétopimin chez les ovins et de 75 mg/kg chez les bovins n'entraîne pas de manifestations toxiques ; toujours par voie orale, la DL50 est supérieure à 5000 mg/kg chez le rat et la souris et à 2000 mg/kg chez le chien (extrait du dossier d'A.M.M. pour l'HAPADEXND).

Chez les animaux de laboratoire, administré sous forme de solution dans l'eau (rat et souris) et de capsule (chien) le nétohimin a donné les résultats suivants dans les travaux de Picard, 1991 :

DL 50 par voie orale :

Souris : > 5 000 mg/kg

Rat : > 5 000 mg/kg

Chien : > 2 000 mg/kg

DL 50 par voie intraveineuse :

344 mg/kg pour les souris mâles

570 mg/kg pour les souris femelles

786 mg/kg pour les rats mâles

659 mg/kg pour les rats femelles

Par voie intraveineuse, la mort apparaît immédiatement après l'intervention. Par voie orale, aucune mortalité n'a été observée chez aucune espèce ; tout au plus quelques selles molles et des rougeurs des muqueuses à 1000 mg/kg.

Chez les espèces cibles, Picard, 1991, ne signale aucun effet toxique chez les ovins à 150 mg/kg par voie orale et chez les bovins à 500 mg/kg par voie parentérale.

Cette expérience de Picard, 1991, montre que le coefficient de sécurité, fonction de l'espèce et de la voie d'administration est supérieur à 7,5 et peut atteindre 40.

Chez les ruminants, d'une manière générale, les auteurs consultés quant au spectre d'activité du nétohimin, ne signalent aucune manifestation toxique, et ceci pour des posologies orales ou sous-cutanées variant de 5 à 20 mg/kg.

▪ Toxicité subchronique du nétohimin :

Lors d'administration de nétohimin durant 90 jours chez le rat et chez le chien, les doses maximales sans effet sont de 93 mg/kg/j chez le rat et de 190 mg/kg/j chez le chien. Ces doses dépassées, Talon, 1989, observe des lésions cutanées et des atrophies testiculaires chez le rat ; des vomissements et diarrhées chez le chien. Ces troubles digestifs chez le chien rappellent le cas clinique d'aplasie médullaire iatrogène rapporté par Stokol *et al.*, 1997, au sujet de la toxicité sur la moelle osseuse de l'albendazole. Il est probable que le nétohimin présente également cette toxicité chez les carnivores.

Chez le mouton, l'administration de doses répétées de 155 mg/kg peut entraîner la mort.

Picard, 1991, confirme que la posologie de nétohimin sans effet pendant 13 semaines est de 93 mg/kg/j chez le rat et de 190 mg/kg/j chez le chien.

▪ Effets mutagènes du nétohimin :

Aucun effet mutagène du nétohimin n'a été observé sur les trois tests suivants réalisés par Picard, 1991 : *Salmonella thiphimurium*, lymphosarcome de la souris, synthèse d'ADN dans les hépatocytes primaires du rat.

▪ Effets du nétohimin sur l'opérateur :

Concernant les effets sur l'opérateur, Picard, 1991, affirme que des contacts accidentels de nétohimin avec la peau et les yeux nécessitent un bon rinçage à l'eau.

▪ Effets du nétohimin sur l'environnement :

Concernant les effets sur l'environnement, Picard, 1991, n'observe aucun effet néfaste sur des poissons exposés à une concentration de 853 mg/litre pendant 96 heures. Cependant le nétohimin n'est pas facilement biodégradable.

▪ Toxicité du nétohimin sur le développement embryonnaire :

La quasi-totalité des composés embryolétaux et tératogènes sont des benzimidazoles carbamates (Delatour *et al.*, 1976). On parle de benzimidazoles carbamates par opposition au noyau benzimidazole seul ou aux thiazolyl benzimidazoles.

Les benzimidazoles carbamates présentent souvent une embryotoxicité importante chez la ratte et la brebis ; elle est plus faible pour la vache et la truie. L'intensité des effets observés varie en fonction de la dose et de la période d'administration selon Talon (Talon, 1989).

Les travaux de Delatour *et al.*, 1976 ont permis de monter l'activité embryotoxique et tératogène du groupement méthylcarbamate en position 2 sur le cycle, et surtout des groupements propylthio et propylsulfinyl en position 5. La fonction propylsulfonyl en 5 et les 2-aminobenzimidazoles ne sont pas toxiques. Ceci laisse prévoir une embryotoxicité potentielle pour les métabolites albendazole et sulfoxyde d'albendazole du nétohimin. Les expériences de Martin sur dix métabolites de l'albendazole (Martin, 1980) montrent effectivement l'activité toxique de ces composés qui se manifeste par des malformations externes (brachiouries, exencéphalies, méningocèles, ectrodactylies, becs de lièvre...) et des malformations squelettiques (corps vertébraux bipartites, fusions costales et vertébrales...).

Comme dans le cas de l'activité anthelminthique, l'action toxique de la molécule est liée à son pouvoir de fixation sur les microtubulines cellulaires, provoquant ainsi des altérations de la mitose.

La molécule de nétohimin présente une affinité très faible pour les microtubulines (Delatour *et al.*, 1986) ; son caractère embryotoxique potentiel est ainsi certainement lié à ses métabolites et en particulier au sulfoxyde.

Après ces généralités, envisageons les particularités spécifiques :

LA RATTE :

Une administration de 17,7 mg/kg de nétohimin par voie orale entre le 8^{ème} et le 15^{ème} jour de gestation (période critique de l'organogenèse) est sans effet. Il faut atteindre une dose de 44,2 mg/kg pour noter une diminution du poids des fœtus ainsi que des malformations externes et squelettiques. La dose de 88,4 mg/kg est fortement embryolétale (98,7%) et tératogène (Delatour *et al.*, 1986).

Or dans cette espèce le rendement de conversion du nétohimin en albendazole est de 20% ; une posologie de 44,2 mg/kg correspond donc à la formation de 5,6 mg/kg d'albendazole. La dose maximale sans effet trouvée pour l'albendazole par Martin, 1980, est de 6 mg/kg. Ceci tend à prouver que l'embryotoxicité du nétohimin et celle de l'albendazole, chez le rat, sont qualitativement semblables et dues au même métabolite : le sulfoxyde d'albendazole.

Toujours dans les travaux de Delatour *et al.*, 1986, des tubulines de cerveau bovin sont incubées avec un milieu permettant l'assemblage en microtubules en présence de colchicine marquée radioactivement. Le nétohimin n'est pas en compétition avec la colchicine pour la fixation aux microtubulines à la dose de 0,001 M (Delatour *et al.*, 1986). Donc le nétohimin n'est pas par lui-même embryotoxique mais par le fait de ses métabolites.

Un traitement au nétohimin par voie orale à 50 ; 59,5 et 70,7 mg/kg sur des rattes gravides au 10^{ème} jour de gestation a entraîné des résorptions embryonnaires, une diminution du poids des fœtus et une augmentation des malformations squelettiques. Egalement des malformations vasculaires associées aux autres malformations ont été mises en évidence par Navarro *et al.*, notamment des malformations des vaisseaux intercostaux associées à des fusions costales (Navarro *et al.*, 1999).

Chez le rat, espèce considérée comme très sensible, le néobimin a montré un effet embryotoxique et tératogène à des doses supérieures à 91,4 mg/kg dans les travaux de Picard, 1991. Cependant, la voie d'administration n'étant pas précisée, on ne peut comparer avec les travaux de Delatour *et al.*, 1986.

Plusieurs études suggèrent que la capacité des benzimidazoles à se fixer sur la tubuline des cellules soit responsable de l'embryotoxicité selon Cristofol *et al.* (Cristofol *et al.*, 1997c). Dans leurs travaux, des rattees gravides sont traitées au 10^{ème} jour de gestation avec du néobimin par voie orale aux doses de 50 ; 59,5 et 70,7 mg/kg. D'après le résultat des expériences pharmacocinétiques, les embryons restent exposés à l'albendazole pendant plus de douze heures et au sulfoxyde et à la sulfone d'albendazole pendant approximativement 36 à 48 heures.

Les analyses de l'incidence de la toxicité du développement pour les trois doses étudiées et la corrélation entre les concentrations en toxique dans les embryons révèlent que la concentration en sulfoxyde d'albendazole pourrait être le principal facteur expliquant l'embryotoxicité. En effet, la concentration en sulfoxyde d'albendazole est significativement plus élevée à la posologie de 59,5 mg/kg qu'à celle de 50 mg/kg alors qu'il n'y a pas de différence statistique entre 59,5 et 70,7 mg/kg. Parallèlement, les différences dans le poids des fœtus sont significatives entre 50 et 59,5 mg/kg mais pas entre 59,5 et 70,7 mg/kg.

Aussi, une augmentation significative des résorptions embryonnaires dès 59,5 mg/kg est notable ainsi que l'apparition de malformations externes et squelettiques dès cette posologie (Cristofol *et al.*, 1997c).

Ainsi chez le rat, diverses études prouvent l'embryotoxicité du néobimin, qui, *in vivo*, est due au métabolite sulfoxyde d'albendazole.

LA BREBIS :

Santiago *et al.*, 1985, étudient l'action du néobimin sur 251 brebis traitées oralement à 20 mg/kg pendant le dernier tiers de gestation. Il ne note aucune augmentation du taux d'avortements, aucune diminution de poids des nouveau-nés, ni aucune malformation chez ceux-ci.

Notons que la période d'organogenèse étant terminée lors de l'administration du néobimin, l'absence de malformation ne peut être mise en rapport avec l'innocuité du néobimin.

Fabre *et al.* observent des malformations congénitales sur 75% des agneaux issus de mères traitées oralement à 20 mg/kg de néobimin le 17^{ème} jour de gestation. Ils observent également une baisse de la fertilité de 40% et de la prolificité de 0,5.

Parmi les agneaux malformés ils observent : l'agénésie d'un rein, une asymétrie diaphragmatique, l'agénésie d'une corne utérine, une asymétrie des globes oculaires, des particularités de la face, des anomalies vertébrales et costales et l'agénésie d'un membre (Fabre *et al.*, 1989). Cette observation clinique, réalisée dans le Sud Ouest, revêt une importance toute particulière pour notre travail. C'est à partir de là que la dynamique de recherche sur le sulfoxyde d'albendazole au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse a été lancée en collaboration avec la Faculté Vétérinaire de Barcelone.

D'ailleurs suite à cette observation clinique, l'équipe de Navarro à Barcelone a expérimenté l'embryotoxicité du néobimin chez la brebis (Navarro *et al.*, 1998). Quatorze brebis Manchega sont traitées au 17^{ème} jour de gestation à 20 mg/kg de néobimin. Navarro *et al.* observent des avortements et 60% des agneaux sont malformés. Parmi ces malformations, ils observent principalement des anomalies squelettiques et rénales ainsi que vasculaires.

Parmi les anomalies squelettiques, les anomalies vertébrales sont les plus communément observées. Souvent lors d'observation du fusion vertébrale en région thoracique, Navarro *et al.* observent aussi une fusion des côtes concernées. Une hypoplasie du membre thoracique gauche est aussi observée avec ectromélie du radius, de l'ulna, du carpe et des métacarpiens ainsi qu'une syndactylie du troisième et du quatrième doigt.

Parmi les anomalies rénales observées, l'ectopie rénale est la plus fréquente devant l'agénésie rénale ou l'hypertrophie.

Toutes les anomalies vasculaires révélées dans leur étude sont liées à d'autres malformations, elles ne sont jamais indépendantes : l'agénésie de l'artère rénale accompagne l'agénésie du rein sur un fœtus ; la duplication de l'artère spinale ventrale accompagne une *spina bifida* sur un autre fœtus...

Pour déterminer quel métabolite atteint le fœtus après administration de nétohimin, Cristofol *et al.* utilisent des brebis en fin de gestation et leur administrent 20 mg de nétohimin par kg par voie orale. Ni le nétohimin, ni l'albendazole ne sont détectés dans le plasma de ces brebis et dans le plasma de leurs fœtus. Les concentrations en sulfoxyde et sulfone d'albendazole sont comparables dans la veine jugulaire et la veine ovarique ; ce qui suggère que ces deux métabolites ne soient pas transformés lors de leur passage dans la sphère génitale femelle. La concentration en sulfoxyde et sulfone d'albendazole dans la veine et l'artère ombilicale ainsi que dans le liquide amniotique et allantoïdien est moitié moins élevée que celle retrouvée dans le sang maternel. Cristofol *et al.* en déduisent que le placenta filtre environ la moitié de ces métabolites sans les transformer (Cristofol *et al.*, 1995).

Ainsi chez la brebis, diverses études prouvent l'embryotoxicité du nétohimin, qui, *in vivo*, est due au métabolite sulfoxyde d'albendazole.

LA VACHE :

Le nétohimin est sans effet sur la gestation de 70 animaux traités à la dose de 7,5 mg/kg per os ou de 12,5 mg/kg par voie sous-cutanée ; l'auteur ne précisant pas la période d'administration (Santiago *et al.*, 1985).

Cependant, le sulfoxyde d'albendazole est retrouvé dans le liquide utérin de génisses traitées avec de l'albendazole (Piscopo *et al.*, 1997a). La vache doit donc être sensible à l'embryotoxicité du nétohimin mais après administration de très fortes posologies. Dans le cadre des posologies recommandées par le fabricant, aucune toxicité sur l'embryon n'est à craindre.

DANS L'ŒUF :

Le sulfoxyde d'albendazole n'a pas une distribution homogène dans l'œuf. Lors de l'utilisation de l'œuf embryonné dans les études de screening sur la toxicité d'un xénobiotique, la dose et le moment de l'injection devront être précisés (Navarro *et al.*, 1997). Manesse, 1993, note également l'existence d'une distribution différentielle du sulfoxyde d'albendazole entre les divers compartiments de l'œuf. Il a en effet constaté qu'après injection dans l'albumen, la distribution de ce xénobiotique, métabolite du nétohimin, était différentielle dans les compartiments de l'œuf, mais il n'a pas pu mettre en évidence son embryotoxicité pour l'embryon de poulet (Manesse, 1993).

L'étude du nétohimin nous a beaucoup apporté. Tout d'abord, le nétohimin étant la prodrogue de l'albendazole qui est embryotoxique, nous avons pu « disséquer » une molécule qui a une réelle toxicité sur le développement, par l'intermédiaire de ses métabolites. Sur plusieurs espèces différentes nous avons pu mesurer tout son pouvoir tératogène, en particulier sur la brebis dans le cas clinique dramatique présenté par Fabre *et al.*, 1989, où un éleveur, suite au non-respect des contre-indications données par le fabricant, a vu 75% de ses agneaux naître avec des malformations. Ce chiffre est énorme, plus important que tous ceux cités dans les modèles expérimentaux de l'embryotoxicité.

Ensuite, le nétochim nous a permis de comprendre en quoi la maîtrise de la pharmacocinétique est primordiale dans l'étude d'un xénobiotique. Les retombées de cette science sont multiples, dans le domaine de l'efficacité de la molécule, de la compréhension de son mode d'action et de sa toxicité. C'est le point de départ du raisonnement scientifique qui conduit à la connaissance parfaite d'un xénobiotique et donc à son utilisation raisonnée.

L'étude du spectre d'activité du nétochim nous a permis également d'envisager l'efficacité d'une manière un peu moins manichéenne. L'utilisation d'une molécule pour détruire des êtres vivants (parasites, bactéries, champignons) ne doit jamais être un geste banal. Certes, le fabricant donne des indications mais il faut être conscient que selon les souches de parasites ou bactéries abordées, des résistances sont toujours possibles ; au praticien de les gérer au mieux afin de ne pas « émauser » ses armes thérapeutiques. Là encore la pharmacocinétique nous apporte de précieuses leçons...la coadministration avec d'autres molécules peut aider le praticien, le jeûne des animaux avant traitement peut augmenter la biodisponibilité du métabolite actif...tout un ensemble de données qui ne devraient pas être ignorées des thérapeutes qui ont, de plus en plus, la lourde responsabilité de garder toute l'efficacité de notre palette thérapeutique face à un monde vivant qui cherche toujours à reprendre ses droits.

C- Législation du médicament vétérinaire et toxicité du développement :

L'étude de l'embryotoxicité d'un médicament vétérinaire est nécessaire pour garantir les risques liés à son emploi. En effet, des accidents tels ceux décrits en 1973 par Lapras *et al.* ne sont plus tolérables dans notre société où nous évoquons très souvent le principe de précaution (Lapras *et al.*, 1973c).

L'étude de la toxicité du médicament vétérinaire est rendue obligatoire par la législation communautaire et française ; et plus particulièrement par le biais de l'autorisation de mise sur le marché.

En effet, aucun médicament ne peut être délivré s'il n'a reçu, au préalable, une autorisation de mise sur le marché délivrée par l'autorité administrative (liste bibliographique des textes officiels : 1, 20, 29, 22, 24, 26, 27, 28).

Cette autorisation n'est délivrée que si le fabricant prouve :

- l'innocuité du médicament dans les conditions normales d'emploi ;
- l'effet thérapeutique du médicament ;
- qu'une méthode de fabrication et des procédés de contrôle garantissent la qualité du produit au stade de fabrication en série.

Le responsable de la mise sur le marché devra également déterminer pour ce produit des temps d'attente et une analyse qualitative et quantitative (liste bibliographique des textes officiels : 2, 21, 22, 24, 26, 16, 19).

Pour vérifier l'ensemble de ces propriétés, il est donc pratiqué trois types d'essais ou expertises dont les comptes rendus figurent au dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché :

- essais analytiques ;
- essais pharmaco-toxicologiques ;
- essais précliniques et cliniques (liste bibliographique des textes officiels : 3, 4, 22, 24, 26, 27, 16, 19).

Ces essais sont conduits par des experts agréés dont la liste est dressée par le ministre de l'agriculture après avis du ministre de la santé (liste bibliographique des textes officiels : 5). De plus, chaque essai doit être prévu à l'avance et déclaré au ministre de la santé et au ministre de l'agriculture (liste bibliographique des textes officiels : 6).

Dans le compte-rendu des essais analytiques (physico-chimiques, biologiques ou microbiologiques), l'expert se prononce sur la conformité du produit à la composition déclarée et sur la valeur des méthodes de contrôle qui seront utilisées par le fabricant (liste bibliographique des textes officiels : 23, 25, 27, 8, 9, 13, 16, 19, 7).

Le compte-rendu des essais cliniques comprend les conclusions relatives :

- à l'innocuité dans les conditions normales d'emploi,
- à la posologie et à la durée du traitement et de la période d'observation,
- aux indications et à l'effet thérapeutique,
- aux contre-indications, aux effets secondaires indésirables, aux interactions constatées éventuellement avec d'autres médicaments ou additifs alimentaires,
- aux conditions normales et particulières de prescription, de délivrance et d'emploi,
- aux risques cliniques de surdosage (liste bibliographique des textes officiels : 8, 11, 12, 15, 16, 19, 23, 25, 27).

Les essais cliniques doivent être précédés d'essais pharmacologiques et toxicologiques qui nous intéressent plus particulièrement (liste bibliographique des textes officiels : 23, 25, 27).

Les essais pharmacologiques et toxicologiques doivent mettre en évidence :

- les limites de toxicité du médicament et ses effets dangereux ou indésirables éventuels dans les conditions d'emploi prévues chez l'animal ;
- ses propriétés pharmacologiques ;
- dans quelle mesure, il existe ou non des résidus, leur incidence sur l'homme et la transformation des denrées (liste bibliographique des textes officiels : 8, 10, 14, 16, 19, 23, 25, 27).

Si la législation concernant la toxicité du médicament vétérinaire est devenue de plus en plus précise au fil des arrêtés ministériels et des directives européennes, la partie concernant les effets embryotoxiques et fœtotoxiques, y compris la tératogénicité, a relativement peu évolué.

Dans l'arrêté ministériel du 4 juillet 1977 concernant le protocole applicable aux essais toxicologiques et pharmacologiques des médicaments vétérinaires, il est spécifié qu'une étude de la toxicité fœtale est nécessaire. Cette étude consiste à examiner les phénomènes toxiques et abortifs qu'il est possible d'observer dans le produit de la conception lorsque le médicament est également destiné à la femelle au cours de la gestation. Les essais en question peuvent être effectués dans le cadre des essais cliniques.

Aussi, toujours dans l'arrêté ministériel du 4 juillet 1977, un examen de la fonction reproductrice est obligatoire si les résultats des autres expérimentations laissent apparaître des éléments de nature à faire soupçonner des altérations de la fécondité mâle ou femelle ou des effets néfastes pour la descendance.

Enfin, dans ce même arrêté ministériel du 4 juillet 1977, au cours de l'étude des effets des résidus, des expérimentations de nature à révéler des effets tératogènes sont indispensables :

- pour les substances qui présentent une analogie chimique étroite avec des produits reconnus tératogènes ;
- pour les substances qui, lors de l'étude des effets sur les fonctions de reproduction, ont provoqué des manifestations suspectes ;
- pour les molécules nouvelles présentant une structure chimique sans analogie avec des produits aux effets connus.

L'étude des effets tératogènes doit être effectuée sur au moins deux espèces d'animaux : le lapin (d'une race sensible à des substances douées de toxicité fœtale) et le rat ou la souris (en précisant la souche). Les modalités de l'expérience (nombre d'animaux, doses, moment de l'administration et critères d'évaluation des résultats) sont déterminés en tenant compte de

l'état des connaissances scientifiques au moment du dépôt du dossier et de la signification statistique que les résultats doivent atteindre.

Ainsi, dès 1977, la législation prévoit que tout médicament vétérinaire mis sur le marché doit avoir subi des essais concernant la toxicité sur le développement. Même lorsque le médicament n'est pas destiné à des femelles au cours de la gestation, par le biais de l'étude de la toxicité des résidus, on peut être sûr que la toxicité sur le développement a été étudiée. Reste le cas des médicaments vétérinaires qui ne sont ni destinés à des animaux de rente, ni destinés à des femelles au cours de la gestation ; dans ce cadre là, la toxicité sur le développement ne serait pas obligatoirement étudiée et donc seule une prescription hors A.M.M. (autorisation de mise sur le marché) pourrait amener à des risques tératogènes.

L'arrêté ministériel du 5 septembre 1994 précise qu'il est nécessaire d'éclairer les cliniciens sur la possibilité d'utiliser le médicament en thérapeutique et sur les dangers liés à son emploi. Ainsi une partie sur l'étude de la toxicité au niveau de la reproduction, y compris la tératogénicité y est décrite.

Les grandes lignes de l'arrêté ministériel du 4 juillet 1977 sont conservées.

L'étude des effets au niveau de la reproduction est étendue. Dans l'arrêté ministériel du 4 juillet 1977, cette étude avait lieu si d'autres résultats laissaient apparaître des éléments de nature à faire soupçonner une telle toxicité. Depuis 1994, l'étude de ce type de toxicité est obligatoire pour les médicaments destinés à des animaux produisant des denrées alimentaires. Elle doit être pratiquée sur une espèce au moins, appartenant généralement à l'Ordre des Rongeurs, et porter sur deux générations. La substance ou le médicament à l'étude est administrée à des animaux mâles et femelles à des intervalles de temps déterminés précédant l'accouplement. L'administration doit être poursuivie jusqu'au sevrage des animaux de la génération F2. Il convient d'utiliser au moins trois doses différentes. La dose la plus élevée doit normalement être choisie de façon à faire apparaître des effets nocifs. Les doses les plus faibles ne doivent produire aucun signe de toxicité. L'appréciation des effets sur la reproduction est faite sur la base de l'examen de la fécondité, de la gestation et du comportement maternel : l'allaitement, la croissance et le développement sont observés sur les animaux de la génération F1 de la conception à la maturité ; le développement des animaux de la génération F2 est étudié jusqu'au sevrage.

L'étude des effets embryotoxiques et fœtotoxiques, y compris la tératogénicité est également plus étendue dans l'arrêté ministériel du 5 septembre 1994 que dans celui du 4 juillet 1977. Alors que cette étude n'avait lieu que si le médicament était destiné à la femelle au cours de la gestation dans l'arrêté ministériel du 4 juillet 1977, dans l'arrêté ministériel du 5 septembre 1994, cette étude est obligatoire dans le cas de substances ou de médicaments destinés aux animaux producteurs d'aliments ou de compagnie destinés à la reproduction. Les conditions de l'étude sont, en plus, précisées que ce soit chez les animaux de rente ou de compagnie. Elle doit être menée sur au moins deux espèces de mammifères, généralement un rongeur et le lapin. Les détails de l'expérimentation (nombre d'animaux, doses, heure d'administration et critères d'évaluation des résultats) dépendent de l'état des connaissances scientifiques à la date où la demande est déposée et du degré de signification statistique que les résultats doivent atteindre. Dans le cas de substances ou de médicaments non destinés à des animaux producteurs d'aliments, une étude des effets embryotoxiques et fœtotoxiques, y compris la tératogénicité, est exigée sur au moins une espèce, qui peut être l'animal de destination si le produit est destiné à des animaux susceptibles d'être utilisés pour la reproduction.

Donc depuis 1994, seul un médicament non destiné aux animaux de rente, et interdit chez les animaux de compagnie reproducteurs n'est pas étudié du point de vue toxicité du développement.

Etant donné que tout médicament destiné à un animal de rente subit des études de toxicité au niveau de la reproduction, y compris la tératogénicité, la partie sur l'étude des résidus et leur

toxicité au niveau de la reproduction rencontrée dans l'arrêté ministériel du 4 juillet 1977 a disparu dans l'arrêté ministériel du 5 septembre 1994.

En ce qui concerne les médicaments vétérinaires immunologiques, une étude de la fonction reproductrice doit être envisagée chaque fois que certaines données suggèrent que la matière première dont est issu le produit peut constituer un facteur de risque potentiel pour cette fonction. Si tel est le cas, la fonction reproductrice doit être étudiée chez le mâle et chez la femelle gravide et non gravide en utilisant la dose préconisée et les voies d'administration recommandées. Il faut, en outre, étudier les effets nocifs sur la descendance ainsi que les effets tératogènes et abortifs.

L'arrêté ministériel du 24 janvier 2001 modifiant celui du 5 septembre 1994 n'ajoute rien en ce qui concerne la législation de la toxicité des médicaments vétérinaires sur le développement.

Dans les directives CEE, les mêmes exigences que celles données dans l'arrêté ministériel du 5 septembre 1994 sont reprises en ce qui concerne la toxicité des médicaments vétérinaires sur le développement embryonnaire et la reproduction.

En conclusion, presque tous les médicaments vétérinaires sont testés avant mise sur le marché du point de vue toxicité sur le développement. Seul dans le cas des médicaments interdits chez les animaux de rente et les animaux de compagnie destinés à la reproduction, aucune étude de la toxicité embryonnaire n'est réglementairement prévue.

D- L'embryon de poulet et la tératologie :

1- Vers un nouveau modèle d'évaluation de l'embryotoxicité ?

Pour garantir l'innocuité des médicaments dans les conditions normales d'emploi, le législateur prévoit de nombreux essais avant mise sur le marché. Il serait trop coûteux et non éthique d'expérimenter le pouvoir tératogène d'une molécule sur toutes les espèces auxquelles le médicament est destiné car, lors de ces essais, des lots importants d'animaux maintenus strictement dans les mêmes conditions expérimentales sont nécessaires. Ainsi il est admis que lors des études embryotoxicologiques des modèles d'évaluation soient utilisés.

En ce qui concerne les médicaments vétérinaires et l'évaluation de l'embryotoxicité (y compris la tératogénicité), nous avons vu précédemment que les modèles d'évaluation retenus sont différents selon qu'il s'agit d'un médicament destiné à des animaux de compagnie ou à des animaux producteurs de denrées alimentaires.

Pour les médicaments destinés à l'animal de compagnie, l'embryotoxicité est évaluée sur au moins une espèce animale, qui peut être l'animal de destination.

Pour les médicaments destinés à des animaux producteurs de denrées alimentaires, l'embryotoxicité est évaluée sur au moins deux espèces de mammifère, généralement un rongeur et le lapin (liste bibliographique des textes officiels : 16).

En ce qui concerne les médicaments à usage humain, la toxicité potentielle du produit et ses effets dangereux ou indésirables éventuels dans les conditions d'emploi prévues chez l'homme doivent être estimés en fonction de l'état pathologique considéré (liste bibliographique des textes officiels : 17, 18). Cependant une étude de la toxicité embryofœtale et périnatale est prévue pour les médicaments destinés à la femme au cours de la grossesse. La non-réalisation de cette étude soit pour les médicaments qui, d'habitude, ne sont pas employés par les femmes susceptibles d'avoir des enfants, soit pour d'autres cas doit être justifiée. Cette étude consiste à examiner les phénomènes toxiques, notamment tératogènes, qu'il est possible d'observer dans le produit de la conception. Le législateur précise en plus : « Bien que ces

essais n'aient jusqu'à présent qu'une valeur prévisionnelle limitée en ce qui concerne la transposition des résultats à l'espèce humaine, ils permettent de recueillir des informations importantes lorsque les résultats montrent des phénomènes tels que résorptions, anomalies, etc. ». En règle générale, les essais de toxicité embryofœtale seront réalisés sur deux espèces, dont l'une ne sera pas un rongeur. Les études péri et post natales seront effectuées sur au moins une espèce. Lorsqu'il est établi que le métabolisme d'un médicament dans une espèce donnée est semblable à celui de l'homme, il est opportun d'inclure cette espèce dans l'étude. Il est également souhaitable qu'une des espèces utilisées soit identique à une de celles utilisées pour l'étude de toxicité par administration répétée. Les modalités de l'essai (nombre d'animaux, doses, moment de l'administration et critères d'évaluation des résultats) seront déterminées en tenant compte de l'état des connaissances scientifiques et du niveau statistique que les résultats doivent atteindre.

Donc que ce soit pour les médicaments vétérinaires ou humains, trois modèles d'évaluation de l'embryotoxicité sont couramment utilisés : le rat, la souris et le lapin. Le législateur n'en exclut pas d'autres puisqu'il évoque quelquefois des espèces animales, d'autres fois des espèces de mammifère, et qu'il donne un nombre minimum légal d'espèces utilisées mais pas de maximum. D'autre part, il est bien précisé que le choix des modèles d'évaluation doit être en accord avec l'évolution des connaissances scientifiques.

Or sur le plan scientifique, ces modèles sont loin d'être suffisants pour expliquer la complexité des mécanismes impliqués lors de l'apparition d'un phénomène d'embryotoxicité. Le législateur concède effectivement que la valeur prévisionnelle de ces essais est limitée en ce qui concerne la transposition des résultats à l'espèce humaine (liste bibliographique des textes officiels : 17, 18).

Aussi, lors de l'étude de quelques benzimidazoles embryotoxiques, nous avons vu que pour certaines molécules, le pouvoir tératogène est inconstant selon les espèces voire même les souches utilisées. Rappelons le cas du parabendazole : selon Lapras *et al.*, 1973, et L. Mercier-Parot, 1976, le parabendazole est tératogène chez la brebis, le rat, la souris mais pas chez le lapin (Lapras *et al.*, 1973 a, b, c ; Mercier-Parot, 1976). L. Mercier-Parot a également mis en évidence des sensibilités différentes au pouvoir tératogène du parabendazole selon les lignées de souris. Elle rapporte même une expérimentation de Lemon et Hancock de 1974 concluant à l'absence d'effet tératogène du parabendazole chez les ovins (Mercier-Parot, 1976 ; Lemon *et al.*, 1974). En 1983, Delatour rappelle également que la sensibilité aux agents tératogènes est spécifique selon les espèces animales choisies. Il rappelle le cas du parabendazole qui est tératogène chez la souris, le rat et le mouton mais pas chez le lapin, le porc et le chien. Il cite également le célèbre cas du thalidomide qui est tératogène chez la souris, le lapin, le porc, le chien, le singe, l'homme mais pas chez le rat (Delatour, 1983). Le cas du thalidomide est en effet célèbre en tératologie. Manesse commence d'ailleurs sa thèse ainsi : « La nécessité de réaliser des essais sur l'embryotoxicité des médicaments n'est plus à démontrer. Personne n'a oublié la désastreuse utilisation du thalidomide dans les années 60. C'est à la suite de cet accident qu'ont été établis des accords internationaux imposant à tout médicament de médecine humaine un contrôle tératologique, sur au moins deux espèces de mammifère, avant sa commercialisation. Ceci s'est traduit en particulier par la création, aux Etats-Unis, de la « Commission on drug safety » en 1962, de la publication de l'ouvrage « teratology. Principles and techniques » (Wilson *et al.*, 1965) et, en France, par l'arrêté ministériel du 27 avril 1972. » (Manesse, 1993). Bertrand *et al.*, 1963 ont également expérimenté le pouvoir tératogène du thalidomide sur diverses espèces. La même constatation de sensibilité différente selon les espèces animales au pouvoir tératogène d'une molécule qui est tristement célèbre par son embryotoxicité chez l'homme est à nouveau soulevée (Bertrand *et al.*, 1963). Selon Chassagne *et al.*, 1962, les doses de thalidomide entraînant des malformations sont différentes selon les espèces : de 250 à 500 mg/kg/j chez la souris, 125 mg/kg/j chez le lapin et 1 à 2

mg/kg/j chez l'homme (Chassagne *et al.*, 1962). Tuchmann-Duplessis *et al.* soulignent que l'emploi de la souris et du lapin pour des essais d'embryotoxicité s'avère très utile car leur grande sensibilité permet souvent de déceler des activités tératogènes qui ne se manifestent pas chez le rat (Tuchmann-Duplessis et L. Mercier-Parot, 1965).

Ainsi nous voyons tout l'intérêt, en terme de sécurité du médicament, de multiplier les essais d'embryotoxicité sur différents modèles d'évaluation. Les modèles actuellement utilisés (rat, souris, lapin) ne peuvent à eux seuls garantir l'innocuité d'un médicament compte tenu de la variabilité de la sensibilité aux agents tératogènes selon les espèces choisies. Bertrand et Delatour soulignent que l'absence d'un réactif biologique présentant une sensibilité identique à celle de l'espèce humaine vis-à-vis des agents tératogènes et l'irrégularité des réponses dans l'échelle zoologique imposent dans les épreuves de contrôle le recours à plusieurs espèces : au moins trois (Bertrand *et al.*, 1967).

Cependant, compte tenu du coût de ce type de recherche, nous ne pouvons expérimenter l'embryotoxicité que sur un nombre limité de mammifères, ce qui nous amène à considérer un « nouveau » modèle, moins coûteux mais peut-être tout aussi intéressant en tératologie : l'embryon de poulet.

En effet, l'embryon de poulet pourrait aussi servir de modèle d'évaluation de l'embryotoxicité. Ce n'est pas un nouveau modèle puisque c'est avec l'embryon de poulet qu'Ansel a ouvert le chapitre de la chimiotératogénèse à une période où presque personne ne pensait à ce problème (Ansel, 1950).

L'embryon de poulet se développe en dehors de l'organisme maternel ce qui lui confère une grande facilité d'accès. Pour cette raison, il a été observé depuis l'antiquité (Hippocrate de Cos, « De Natura pueri », 460-380 avant J.C.). Depuis les études se sont succédées pour décrire avec précision son développement qui est bien connu. Dès 1889, Mathias Duval en donne un compte-rendu très précis (Duval, 1889). En embryologie, le développement de l'embryon de poulet a été comparé à celui des mammifères et nombreux sont les auteurs qui concluent que ces développements sont comparables (Ansel, Wolf, Stoll). A la fin du XIX^{ème} siècle, les biologistes, dont Haeckel fut le chef de file, pensaient que tous les embryons passaient par un stade précoce identique, le stade phylotypique, et que les différences interspécifiques apparaissaient ultérieurement. Cette théorie soutenait que l'embryogenèse est un condensé de l'évolution. Haeckel avançait même dans sa loi biogénétique que le développement des mammifères contenait dans ses lignes générales le développement des oiseaux. Cette théorie a été remise en cause dernièrement par Michael Richardson, professeur d'anatomie et de biologie du développement à la faculté de Médecine de l'Hôpital Saint George à Londres. A la suite des découvertes de Jonathan Slack et ses collègues de l'Université de Bath sur le conservatisme génétique du développement (les gènes nommés homeobox sont des gènes essentiels du développement, en activant ou en inhibant d'autres gènes, ils agissent comme des interrupteurs du développement ; il se trouve que les gènes homeobox de la drosophile sont très proches de ceux des helminthes, de la souris, du poisson et de l'homme), Richardson a voulu retrouver le stade phylotypique décrit par Haeckel. Il s'est aperçu que Haeckel avait falsifié ses dessins et que « les embryons identiques d'Haeckel n'ont existé que dans les livres ». Néanmoins Richardson en revient aux constatations de l'embryologiste Karl von Baer de 1828, les embryons des différentes espèces de vertébré se ressemblent énormément et le développement de l'embryon de poulet est très proche de celui des mammifères (Richardson, 1998 ; Richardson *et al.*, 1997).

Donc par sa facilité d'accès, le développement de l'embryon de poulet est bien connu et comparable à celui des mammifères.

L'embryon de poulet permettrait également un gain de temps et d'argent appréciable lors de l'étude de l'embryotoxicité. En effet, au niveau pratique, l'œuf embryonné présente l'avantage de ne nécessiter ni l'élevage en animalerie, ni le sacrifice de l'organisme maternel,

et la récolte embryonnaire ainsi que les manipulations sont aisées. L'embryon de poulet présente donc des avantages économique et éthique certains (apportant une solution face aux problèmes de l'expérimentation animale et du sacrifice quasi obligatoire des mères).

Mais en fait ce ne sont pas les facilités d'obtention qu'il faut considérer selon Chassagne *et al.*, 1962, voire même l'étendue des connaissances disponibles sur le développement de l'embryon de poulet mais bien la transposition la meilleure possible des résultats à l'espèce humaine ou à l'espèce de destination dans le cadre des médicaments vétérinaires (Chassagne *et al.*, 1962). Or selon la théorie de l'unité biologique citée par Manesse, au niveau tissulaire, cellulaire et biochimique, l'assimilation des résultats obtenus sur l'embryon de poulet à l'embryon de mammifère est parfaitement correcte (Manesse, 1993). De plus selon Stoll, l'emploi de l'embryon de poulet permet d'apprécier commodément, sur des stades bien définis, l'action tératogène d'une substance et les résultats donnent des indications précieuses du fait qu'il existe entre les mammifères et les oiseaux une communauté de réactions tératologiques dans la plupart des cas. Selon Stoll, très peu de substances tératogènes chez les oiseaux ne le sont pas chez les mammifères. Il n'y a en effet pas de lien évident entre la proximité zoologique et la réponse aux agents tératogènes (discussion suivant l'article de Bertrand *et al.*, 1967). Certes pour Bertrand et Delatour l'essentiel serait d'opérer sur une espèce dont la structure placentaire est comparable à celle de la femme : c'est le cas des rongeurs qui, comme les primates, ont une placentation hémochoriale (Bertrand *et al.*, 1967). Selon Bertrand *et al.*, 1963, si l'expérimentation sur l'animal ne peut apporter une garantie absolue d'innocuité pour l'espèce humaine, elle représente du moins un contrôle élémentaire et indispensable, dont la valeur semble d'autant plus probable que les conditions expérimentales sont plus sévères et les espèces étudiées plus proches de l'espèce humaine sur le plan physiologique (Bertrand *et al.*, 1963). Cependant d'un point de vue théorique, l'embryon de poulet représente un excellent modèle de développement en milieu biologiquement fermé (l'œuf), sans interaction avec l'organisme maternel donc plus facile à caractériser et à standardiser d'un point de vue biochimique. En considérant les progrès effectués en pharmacologie, l'embryon de poulet pourrait être un instrument précieux pour étudier les phénomènes de tératogenèse, et l'embryotoxicité en général. De plus en théorie, il est possible de maîtriser parfaitement la concentration de la substance tératogène et sa distribution dans l'œuf. Donc en théorie, pour peu que le métabolisme de la substance à tester soit connu, on peut tout à fait envisager des études de première approche sur le pouvoir tératogène effectuées sur l'embryon de poulet. Cependant le Professeur Bertrand souligne que l'embryon de poulet est infiniment sensible et des facteurs banals (réchauffement, piqûre, injection d'eau distillée) sont par eux-mêmes tératogènes (Bertrand *et al.*, 1967). Or, on peut envisager d'essayer de minimiser ces facteurs externes (qui interagissent sûrement aussi avec la gestation des mammifères) et de maîtriser tous les paramètres de l'embryon de poulet. De plus en considérant des essais contrôlés avec un lot témoin important l'interprétation des malformations dues aux facteurs externes serait possible, d'autant plus qu'un grand nombre d'œufs maintenus dans les mêmes conditions expérimentales est tout à fait envisageable ce qui est plus difficile avec les mammifères de laboratoire. Ainsi le modèle proposé serait en accord avec l'obligation statistique de travailler sur un grand nombre d'individus.

Aussi, comme il existe une communauté de réactions tératologiques entre les oiseaux et les mammifères comme le souligne Stoll, il semblerait qu'aucun résultat erroné par excès soit possible en tout cas pas plus que lors de l'utilisation des rongeurs de laboratoire (discussion suivant l'article de Bertrand *et al.*, 1967).

Enfin, rappelons qu'au début des expérimentations sur le pouvoir tératogène du thalidomide chez les animaux, seul l'embryon de poulet semblait donner les réponses escomptées. Dans les études préliminaires de Bertrand *et al.*, 1963, le rat, la souris et la chienne semblaient insensibles au pouvoir tératogène du thalidomide, il a fallu de fortes doses pour observer une embryotoxicité chez ces espèces alors que de nombreuses malformations, portant

spécialement sur les membres étaient observées chez l'embryon de poulet (Bertrand *et al.*, 1963).

En conclusion, l'embryon de poulet ne peut et ne doit pas se substituer à l'embryon de mammifère cependant il reste une voie à développer et à standardiser (Jelinek *et al.*, 1994 ; Jelinek, 1982). Les laboratoires sont en effet désireux de disposer de techniques alternatives de « screening ». C'est ainsi qu'ils utilisent déjà l'hydre d'eau douce, les cultures cellulaires et les cultures d'embryons. L'embryon de poulet aurait l'avantage de se rapprocher davantage du modèle mammalien que ces dernières techniques. Dans une revue de tous les modèles d'évaluation de l'embryotoxicité autres que les embryons de mammifère, Wilson en conclue que l'embryon de poulet possède des caractéristiques prometteuses pour en faire un nouveau modèle d'évaluation de l'embryotoxicité (Wilson, 1978).

2- Quelques exemples d'étude :

L'embryon de poulet a été étudié comme modèle expérimental de recherche du risque tératogène mais il a également permis la recherche du pouvoir tératogène de divers xénobiotiques. Nous commencerons par les études de l'embryon de poulet comme modèle expérimental, et en particulier par les travaux de Manesse qui sont à l'origine de nos propres travaux sur l'embryon de poulet, et nous citerons ensuite les études du pouvoir tératogène de diverses substances réalisées sur l'embryon de poulet.

En réponse à la constatation de l'embryotoxicité du sulfoxyde d'albendazole le 17^{ème} jour de gestation chez la brebis rapportée par Fabre *et al.*, 1989, Manesse a eu l'idée de créer un modèle expérimental qui permettrait d'approcher les mécanismes d'action du sulfoxyde d'albendazole et éventuellement de prévenir ses effets indésirables (Manesse, 1993). L'embryon de poulet, par sa facilité d'accès, de manipulation et d'observation lui a semblé constituer un support idéal. Cependant pour étudier le pouvoir tératogène du sulfoxyde d'albendazole, il faut utiliser « la bonne dose au bon moment ». La dose embryotoxique du sulfoxyde d'albendazole chez l'agneau est de 1,6 µg/ml (Cristofol *et al.*, 1995) et le moment de la gestation présentant le plus de malformations lors d'administration de néobimin est le 17^{ème} jour (Fabre *et al.*, 1989). Manesse en déduit donc qu'il faut atteindre une concentration de 1,6 µg/ml à la 54^{ème} heure d'incubation chez le poulet pour étudier le pouvoir tératogène du sulfoxyde d'albendazole. Or pour maîtriser la concentration en sulfoxyde d'albendazole, il faut maîtriser le volume interne de l'œuf et la cinétique du sulfoxyde d'albendazole dans les différents compartiments de l'œuf. Ainsi lors de ses travaux, Manesse a prouvé qu'il est possible d'estimer, de façon suffisamment précise, les volumes des différents compartiments de l'œuf à partir de paramètres extérieurs facilement mesurables. Cette estimation est dépendante de la souche de poules pondeuses utilisée. Les volumes des différents compartiments varient suivant la période de l'année. Il faut donc tenir compte des remarques précédentes pour calculer les doses de xénobiotique à injecter dans l'œuf. Les résultats des études de corrélation ne peuvent pas être généralisés. Tout laboratoire désireux d'effectuer un travail similaire devrait effectuer les mêmes études préliminaires. Manesse a également prouvé que l'injection d'un xénobiotique dans l'albumen est simple à réaliser ; il est possible de suivre la distribution du produit dans les différents compartiments de l'œuf. Cependant il existe une distribution différentielle entre les divers compartiments. Manesse note également l'existence d'un gradient de diffusion dans l'albumen. Ainsi, dans son expérimentation, les concentrations en sulfoxyde d'albendazole observées dans l'embryon sont inférieures à la concentration attendue de 1.6 µg/ml. De plus, même si le métabolite apparaît très rapidement dans l'embryon, il est vraisemblable qu'il faille réaliser ces injections plus précocement de manière à obtenir la concentration maximale vers la 54^{ème} heure d'incubation ce qui correspond au 17^{ème} jour de gestation chez la brebis.

Les premiers résultats de Manesse sont encourageants pour l'utilisation éventuelle de l'embryon de poulet en tant que modèle expérimental en toxicologie du développement et montrent la nécessité de connaître et maîtriser plusieurs paramètres (génétique, saison, âge, solvant, mode d'injection et de prélèvement, distribution, diffusion...).

Navarro *et al.*, 1997, ont également étudié l'embryon de poulet en tant que modèle expérimental permettant la recherche du pouvoir tératogène. Dans cette étude la distribution du sulfoxyde d'albendazole dans les différents compartiments de l'œuf est analysée. En effet, Navarro *et al.*, partent du principe qu'afin d'utiliser l'embryon de poulet en toxicologie du développement, il est nécessaire de connaître le volume intérieur de l'œuf dans lequel le xénobiotique va se distribuer ; la plupart du temps, ni la concentration, ni le moment où le xénobiotique entre en contact avec l'embryon ne sont pris en compte. Leur étude va montrer qu'il est possible de prévoir précisément le volume interne de l'œuf dans lequel le xénobiotique diffuse à partir du poids de l'œuf. Les résultats obtenus sur la diffusion du sulfoxyde d'albendazole dans les différents compartiments de l'œuf montrent que le sulfoxyde d'albendazole n'a pas une distribution homogène et qu'il y a des différences de concentration entre les différents compartiments. La concentration embryonnaire en sulfoxyde d'albendazole représentée par l'AUC et la concentration maximale suggère que l'embryon est exposé à des doses plus faibles que celles qui étaient espérées (1,6 µg/ml). La concentration maximale dans l'embryon est atteinte environ 36 heures après l'injection. Donc pour utiliser l'embryon de poulet en toxicologie du développement, il faudrait déterminer avec précision la dose de xénobiotique à injecter en tenant compte du volume de distribution et du délai post-injection nécessaire pour atteindre l'embryon (Navarro *et al.*, 1997).

D'autres auteurs ont étudié l'embryon de poulet en tant que modèle expérimental mais de façon moins poussée que Manesse et Navarro. En effet, l'embryon de poulet sert également de modèle dans des techniques dites de « screening » ou tests rapides. La diffusion ou la concentration atteinte par le xénobiotique ne sont pas étudiées autant que l'on peut le souhaiter dans ce type de test ; on s'intéresse surtout au résultat : toxique ou non toxique. Kotwani décrit en 1998 ces nouvelles techniques de tests tératologiques notamment le CHEST (Chick Embryotoxicity Screening Test) et le Chick Embryo Blastoderm Model. Kotwani explique que l'embryon de poulet présente beaucoup d'avantages : un équipement de laboratoire modeste, une technicité modérée, un investissement modéré en temps et en argent, une facilité d'accès de l'embryon, des connaissances précises en terme de développement embryonnaire et la possibilité de travailler sur des lots importants ce qui facilite l'interprétation statistique (Kotwani, 1998). Dans un autre article, Jelinek en 1982, compare les différents systèmes *in vitro* qui permettent de tester l'influence de différentes substances avec le développement embryonnaire, et parmi tous ces systèmes *in vitro*, l'embryon de poulet présente pour lui le plus d'avantages (Jelinek, 1982). En 1994, Jelinek va même plus loin en comparant le CHEST aux procédures officielles d'évaluation de l'embryotoxicité (rat, lapin). Après étude de 50 substances aux propriétés pharmacologiques différentes, il en arrive à la conclusion que la valeur prédictive positive du CHEST est de 80%. Ainsi pour lui, le CHEST ne remplace pas les procédures officielles d'évaluation de l'embryotoxicité mais contribue au développement de nouveaux modèles d'évaluation basé sur des connaissances récentes en tératologie (Jelinek *et al.*, 1994). Dans sa thèse Manesse cite également les travaux de Luepke sur un autre test rapide : le Hen's Egg Test (HET). Ce test consiste à déposer une substance sur la membrane chorio-allantoïdienne. Il apparaît alors que le HET peut donner des information sur l'embryotoxicité et la tératogénicité (Luepke, 1985).

Ainsi à la lumière de ces différentes études, on voit que l'embryon de poulet est en bonne voie pour devenir un instrument précieux lors des études de recherche du risque tératogène. Nous avons d'ailleurs trouvé dans la littérature quelques études qui emploient l'embryon de poulet

comme modèle expérimental pour étudier l'action de diverses substances sur le développement embryonnaire.

Par exemple, Julian *et al.*, 1998, étudient les effets de l'insuline purifiée pendant les premiers stades de développement de l'embryon de poulet. Lors du traitement du jour 0 au jour 3, ils observent des anomalies des vertèbres caudales et un fort taux de mortalité. Cette période est suivie d'une autre période pendant laquelle ils observent des malformations diverses dominées par un syndrome d'achondroplasie. Ce syndrome d'achondroplasie est plus marqué avec de l'insuline d'origine porcine que de l'insuline d'origine bovine. Les auteurs constatent que la similarité entre les anomalies induites par l'insuline chez l'embryon de poulet et les malformations les plus communes trouvées chez les enfants nés de mère diabétique suggère qu'il existe un mécanisme commun. Cette étude montre que l'embryon de poulet est un excellent modèle *in vivo* de recherche sur le mécanisme d'action de l'insuline durant le développement (Julian *et al.*, 1998).

Enfin l'embryon de poulet a servi dans de nombreuses autres études que nous ne ferons que citer :

- étude de la mortalité et des altérations osseuses par des agents actifs sur les os (Smith *et al.*, 1988) ;
- étude du rôle protecteur de la thyroxine lors d'intoxication au méthylparathion (Ghosh *et al.*, 1998) ;
- étude des effets du lithium sur le développement vasculaire (Giles *et al.*, 1999) ;
- étude des effets tératogènes des insecticides cholinergiques (Misawa *et al.*, 1982) ;
- étude des effets toxiques de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A, seule ou combinées (Edington *et al.*, 1995) ;
- étude des dommages causés par l'urée sur la glande thyroïde (Mora *et al.*, 1991) ;
- étude des effets des drogues muscariniques sur l'activité cholinestérasique et sur le développement des structures de l'œil (Angelini *et al.*, 1998) ;
- étude des effets du LSD sur l'histologie et l'ultrastructure du neuroépithélium (Messier *et al.*, 1976).

En conclusion, à la lumière de ces diverses études sur l'embryon de poulet on sent bien que ce modèle détient des potentialités intéressantes pour la tératologie. Cependant, on sent aussi que l'on ne maîtrise toujours pas les différents paramètres de l'embryon de poulet autant que l'on pourrait le souhaiter lors de l'établissement d'un modèle expérimental. Mais maîtrise-t-on la gestation des rongeurs et des lapins utilisés en tératologie ?

Cela dit de nombreuses recherches seront encore nécessaires pour que l'embryon de poulet atteigne le niveau de modèle expérimental « raisonnable » ; en effet, sa facilité d'accès et les économies qu'il permet ne doivent pas faire oublier ses défauts, s'il reste un domaine où l'argent et le profit n'ont pas leur place, c'est en science qu'il faudrait le chercher et le trouver ; nous voulons dire par-là que si l'embryon de poulet ne présente que des avantages économiques en tératologie mais ne contribue pas à garantir la sécurité du médicament, il faudra abandonner ce modèle.

Cependant l'embryon de poulet ne doit pas être non plus abandonné avant exploration de toutes ses potentialités et juste parce qu'il n'est pas un embryon humain dans ses réactions. Tout modèle expérimental comprend des incertitudes lorsqu'il s'agit de la transposition des résultats à une autre espèce, c'est pour cela qu'il faut multiplier les expérimentations sur différents modèles d'évaluation pour essayer d'atteindre un certain degré de certitude scientifique, pour peu que cela soit possible.

E- La morphométrie et l'embryotoxicité :

Blaise Pascal, philosophe et scientifique auvergnat, affirmait dans De l'esprit géométrique qu'« il n'y a de science que de la mesure ». Il est vrai que, quelle que soit la science, nous cherchons souvent à objectiver les connaissances en faisant appel à des valeurs chiffrées (mathématiques, statistiques, probabilités). L'embryologie et la tératologie n'échappent pas à cette constatation. La morphométrie sert de plus en plus lors des études de toxicité sur le développement. Mais avant de citer des études faisant appel à la morphométrie commençons par la définir.

En fait, la morphométrie fait partie de la vaste biométrie.

La biométrie est, en effet, la science qui étudie à l'aide des mathématiques (statistiques, probabilités, mesures), les variations biologiques à l'intérieur d'un groupe donné. L'anthropométrie, souvent résumée à tort par le terme de biométrie, consiste en la mesure des éléments morphologiques humains.

A l'origine, « morphométrie » est un terme géologique. La morphométrie consiste à étudier et à mesurer la forme et les caractéristiques des éléments d'un dépôt, ayant pour but d'essayer d'en préciser l'histoire.

Par extension, la morphométrie consiste à étudier quantitativement la géométrie des formes, et en particulier le calcul de formes moyennes et de variations autour de ces formes. La morphométrie fait donc partie de la biométrie au sens large.

Ainsi, lorsque l'on mesure des os (périmètre, surface, longueurs) et que l'on étudie les valeurs chiffrées résultant de ces mesures (comparaisons statistiques en particulier), on fait ce que l'on peut appeler une étude morphométrique.

Selon Pagèze, l'utilisation de la morphométrie dans l'étude des phénomènes embryotoxiques est un premier pas vers une tentative de quantification des phénomènes tératogènes afin de mieux les détecter et les envisager sur des bases plus larges que strictement qualitatives (Pagèze, 1995).

Il est vrai que certains phénomènes tératogènes peuvent être mesurés. Quelques benzimidazoles sont effectivement connus pour entraîner des hypo-dysplasies des membres : le parabendazole et le cambendazole (Delatour *et al.*, 1976) ou l'albendazole (Martin, 1980).

Pour ce qui est du squelette appendiculaire, les malformations des os ont souvent été considérées en terme qualitatifs : présence ou absence ; malformations éventuelles (Pagèze *et al.*, 1996). Ceci demande un personnel qualifié lors des études de l'embryotoxicité d'un médicament par exemple. Un autre avantage de la morphométrie est de simplifier et de standardiser l'étude du pouvoir tératogène d'une molécule sur le squelette. L'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image demande une qualification beaucoup moins spécifique lorsque l'on considère l'aspect quantitatif plus que l'aspect qualitatif.

Cependant, les variations quantitatives lors des phénomènes d'embryotoxicité sont assez peu connues et jusqu'ici, ont été peu étudiées. Il est en effet difficile de déterminer à priori à partir de quelle valeur il y a ou non micromélie (membres anormalement courts) ou hypo-dysplasie ?

L'utilisation de la morphométrie en tératologie ne doit pas s'imposer comme un besoin de chiffres pour objectiver des connaissances ou comme un besoin de standardisation des études du pouvoir tératogène sur le squelette embryonnaire.

L'utilisation de la morphométrie en tératologie doit être raisonnée en fonction des phénomènes que l'on peut observer. Il faut au préalable vérifier que la population que l'on va mesurer peut satisfaire à une étude morphométrique. En effet, si la variabilité individuelle des mesures est très grande, seule une influence majeure sur le développement pourra être mise en évidence. Au contraire si certains paramètres sont relativement stables dans une population,

on peut espérer déceler des influences plus discrètes sur le développement embryonnaire compte tenu d'une faible variabilité individuelle.

Pagèze a démontré que certains os du squelette appendiculaire de l'embryon de poulet pouvaient être étudiés sur le plan morphométrique. Six os présentent une stabilité suffisante pour espérer voir des variations dues à l'effet d'un xénobiotique. Le fémur, le tibiotarse, le tarsométatarse, l'humérus, l'ulna et le métacarpe semblent utilisables lors de la comparaison entre une population embryonnaire témoin et une population embryonnaire similaire ayant reçu l'injection d'un xénobiotique dont on veut quantifier l'influence sur le squelette.

Pagèze a également mis en évidence l'intérêt de trois paramètres morphométriques (périmètre, surface, grand diamètre de Férêt) pour des mesures comparatives de l'action de xénobiotiques sur le développement squelettique (Pagèze, 1995 ; Pagèze *et al.*, 1996).

D'autres études utilisent la morphométrie. Les travaux de Satterlee et Roberts, 1987, avec des mesures histologiques ont permis d'étudier l'effet des œstrogènes sur les os d'embryons de poulets en développement ; également les travaux de Migliaccio *et al.*, 1992, permettent de mieux connaître les effets du diéthylstilbestrol sur les os. Avec les méthodes morphométriques, les études de la dynamique cartilagineuse sont également possibles (Ranz *et al.*, 1987 ; Gaytan *et al.*, 1987).

Les exemples d'études s'appuyant sur des mesures morphométriques sont nombreuses et risquent fort de se multiplier quand on sait la facilité d'utilisation du matériel informatique pour traiter des données. L'embryologie et la tératologie vont se doubler d'une valence quantitative grâce au développement de ces techniques.

Cependant, la tératologie ne pourra se limiter à ce genre d'études quantitatives puisque certaines malformations sont plus de l'ordre des anomalies visuelles que de la variation de la taille d'un organe ou d'un os. Cela dit, pour des études de screening, on peut imaginer l'intérêt de ce genre de méthode pour apprécier de façon succincte un xénobiotique, avant la mise en route de protocoles expérimentaux plus lourds par exemple.

II- ETUDE EXPERIMENTALE :

A- Matériel et méthodes :

1- Le matériel biologique :

▪ Les œufs :

Ils sont issus de poules pondeuses, croisement J.A.57 (femelles) et Cou Nu T.44 (mâles). Durant la période de ponte, les poules sont nourries avec un aliment spécial pour pondeuses du commerce (16-18% de protéines ; 2800 kcal/kg). La densité au sol est de 5 poules au m², la température ambiante est de 20°C. Les vaccins habituels sont réalisés avant 18 semaines et ces poules reçoivent un traitement antibiotique à leur entrée en ponte puis tous les deux mois.

▪ Le sulfoxyde d'albendazole :

Ce métabolite de l'albendazole est choisi car il est réputé pour donner des malformations chez les embryons de mammifères (Martin, 1980 ; Delatour *et al.*, 1981b).

Il se présente sous forme de poudre qui nous a été fournie par SMITHKLINE BEECHAM (U.S.A.).

▪ Le solvant :

Il intervient dans les échantillons dits « témoins HCl » et les « traités ».

Ici, le solvant est une solution d'acide chlorhydrique 0.1 N dans de l'eau distillée.

Il sera injecté pur aux embryons dits « témoins HCl » et sera mélangé à la poudre de sulfoxyde d'albendazole afin d'obtenir une solution qui pourra être injectée aux traités.

Ce solvant a été choisi car il permet une bonne solubilité du sulfoxyde d'albendazole ; d'autre part c'est le solvant le plus utilisé dans les études de toxicité des benzimidazoles sur l'embryon de poulet (Blackwood, 1962).

2- Le matériel technique :

Au cours des différentes phases de l'expérimentation ont été utilisés :

▪ Couveuse ou incubateur :

Marque : MEMMERT^{N.D.},

Température : 37.8°C,

Hygrométrie : 60%.

▪ Matériel pour réaliser les injections :

Lampe à ultraviolets,

Seringues de Hamilton (seringues de 10 microlitres précises au 1/10^e de microlitre),

Filtres micropores « Millex GV »,

Seringues à insuline de 1 ml stériles et aiguilles stériles 16-5 « Térumo ».

▪ Matériel de coloration :

Récipients en verre de 250 ml,

Pastilles de soude (NaOH),

Eau distillée,

Ethanol à 70°,

Glycérine à 98%,

Alcool benzylique (Rectapur, Prolabo, RHONE POULENC),

Alizarine S (Alizarine sulfonate de sodium, Prolabo).

▪ **Matériel de dissection :**

Loupe binoculaire « Nikon SMZ-1 » associée à un système d'éclairage par fibres optiques « Fort Gli 156 » et un transformateur « Nikon SN »,
Petit matériel de laboratoire (cristalliseur, bûcher, pinces et ciseaux à dissection fine...).

▪ **L'analyseur d'images :**

Il s'agit d'un analyseur d'images en deux dimensions, c'est-à-dire une caméra reliée à un logiciel informatique de mesures.
Caméra couleur SONY, DXC-930 P,
Logiciel VISIOLAB 1000, version 2.2 (BIOCOM), logiciel sous Windows,
Banc optique BIOCOM.

3- Méthodes :

▪ **De l'œuf à l'embryon :**

Les œufs ne sont jamais stockés plus d'un ou deux jours à température ambiante. Ils sont ensuite acheminés au laboratoire de la Faculté Vétérinaire de l'Université Autonome de Barcelone par voiture (le lieu de ponte et le laboratoire sont distants d'environ 300 km). A leur arrivée au laboratoire, ils sont nettoyés à l'eau du robinet. On évite de les frotter avec des matériaux vulnérants afin de ne pas endommager la coquille ; les plus sales sont simplement nettoyés à l'eau savonneuse puis à l'aide d'un coton imbibé d'un mélange d'alcool-éther. Enfin, ils sont numérotés au crayon carbone et placés dans l'incubateur en position horizontale. Ils sont retournés automatiquement plusieurs fois par jour afin d'éviter l'adhérence de l'allantoïde à la membrane coquillière et la mortalité embryonnaire par étouffement.

La durée d'incubation est de 15 jours et demi , interrompue uniquement quelques minutes lors de la réalisation des traitements à la 54^{ème} heure d'incubation.

▪ **Les différents traitements :**

Les œufs sont sortis au fur et à mesure à la 54^{ème} heure d'incubation (c'est-à-dire au stade 16 selon Hamburger et Hamilton, 1951).

Les témoins : ces œufs ne subissent aucune manipulation.

Les « témoins fenêtre » : la coquille de ces œufs est percée aux ciseaux au niveau du petit bout (côté opposé à la chambre à air). De plus, une fenêtre de 2 cm de côté est découpée à mi-longueur entre le gros et le petit bout de l'œuf. Le trou est ensuite obstrué à l'aide de ruban adhésif placé auparavant sous lampe UV.

Les « témoins HCl » : ces œufs subissent le même traitement que les « témoins fenêtre » mais en plus, on injecte une solution de HCl 0.1N au niveau de la cavité sub-germinale (sous le disque embryonnaire). Le volume injecté varie entre 20 et 30 microlitres selon le poids de l'œuf.

Les « traités » : du sulfoxyde d'albendazole en solution dans de l'acide chlorhydrique 0.1N, à différentes concentrations est injecté de la même manière que l'acide chlorhydrique des « témoins HCl ». Les concentrations testées sont les suivantes : 1 mg/ml ; 0.1 mg/ml ; 0.01 mg/ml et 0.001 mg/ml.

▪ La coloration :

Dissection des embryons :

Au bout des 15 jours et demi d'incubation, les œufs sont sortis de l'incubateur. Ils sont placés une ou deux minutes dans un cristalliseur fermé contenant un coton imbibé d'éther afin d'anesthésier l'embryon.

La coquille, sur laquelle on a appliqué du scotch afin d'éviter qu'elle ne se fende ou que des éclats ne viennent souiller la manipulation, est découpée de façon circulaire à l'aide de petits ciseaux pointus. Elle est ponctionnée à l'aide des ciseaux d'un coup sec, puis découpée en maintenant ceux-ci tangentiellement afin de ne pas abîmer l'embryon. Ce dernier est ensuite disséqué : on enlève la peau, les viscères, les tissus adipeux ainsi que les globes oculaires (il faut prendre soin de retirer la peau des pattes, des ailes et du croupion dès ce stade). Puis les embryons sont rincés à l'eau courante et placés dans des récipients de 250 ml.

La coloration au sens strict :

Après leur extraction de l'œuf, les fœtus sont immergés 10 à 20 jours dans de l'alcool à 70°. C'est le stade de fixation.

Puis ils sont rincés à l'eau courante et maintenus dans une solution d'hydroxyde de potassium à 1 ou 2% (2 grammes de KOH dans 100 ml d'eau) pendant un jour.

Les fœtus sont retirés de la solution d'hydroxyde de potassium, rincés brièvement à l'eau du robinet, et placés dans l'alizarine en solution à 0,03 % dans l'hydroxyde de potassium à 1% pendant deux jours. Il faut agiter de temps en temps les flacons, car l'alizarine sédimente, et surveiller la coloration.

Les fœtus sont retirés de la solution d'alizarine et lavés brièvement à l'eau du robinet, puis ils sont placés dans un mélange de 40% de glycérol, 40% d'alcool éthylique (70°) et 20% d'alcool benzylique pendant un jour.

Les fœtus sont conservés dans une solution de 50% glycérol - 50% alcool éthylique à 70°, ou bien dans le glycérol pur.

Remarque : lorsque l'on change les bains, il faut manipuler l'embryon avec précaution, éviter de le saisir avec des pinces pointues, et le rincer à l'aide d'un jet d'eau basse pression. La température idéale pour procéder à la coloration est de 20 à 22°C (si la température est trop élevée, il y a risque de décomposition).

▪ Les mesures :

Les os mesurés :

Les embryons quittent alors Barcelone pour rejoindre l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse afin de subir différentes mesures. Les os longs ont été étudiés c'est-à-dire les os du squelette appendiculaire de l'embryon de poulet :

- pour le membre pelvien : fémur, tibiotarse et tarsométatarse,
- pour le membre thoracique : humérus, ulna, radius et métacarpe.

Nous avons choisi ces six os car Laurent Pagèze avait montré en 1995 qu'ils sont utilisables lors de la comparaison de paramètres morphométriques entre une population embryonnaire témoin et une population embryonnaire similaire ayant reçue l'injection d'un xénobiotique dont on veut quantifier l'influence sur le squelette (Pagèze, 1995).

De plus, il est aisé de séparer ces os du reste du corps (désarticulation au niveau de l'articulation coxo-fémorale pour le membre pelvien, et scapulo-humérale pour l'aile). Ils sont dans un même plan sagittal lorsqu'on les place de profil en position physiologique, ce qui est

très intéressant car la caméra saisit les images en incidence orthogonale avant de les projeter à l'écran. Ainsi, on peut facilement retrouver pour les membres, la même incidence.

Les paramètres morphométriques :

Nous avons choisi de comparer les os d'embryons témoins et traités au sulfoxyde d'albendazole sur le plan de :

- leur surface,
- leur périmètre,
- et leur longueur, estimée par le logiciel par le biais du grand diamètre de Férêt. Il s'agit de la longueur maximale de la projection orthogonale de l'objet sur des droites passant par son centre de gravité dont l'angle varie de 0° à 180° , avec un pas de 10° .

Le fonctionnement du logiciel :

Le membre de l'embryon est placé dans une boîte de pétri sur le banc optique qui l'éclaire de dessous. A sa verticale est placée la caméra. L'image du membre est transmise à l'ordinateur. Pour obtenir une image de qualité sur laquelle on va pouvoir travailler, il faut régler à ce stade la luminosité et le contraste de manière à rendre le plus transparent possible les tissus adjacents à l'os.

Au niveau du logiciel, chaque point de l'image (dont le nombre dépend de la résolution de la caméra, qui est réglable) se voit attribuer une valeur chiffrée en pixel, l'unité informatique, proportionnelle à son niveau de gris c'est-à-dire à l'intensité de sa coloration.

Extraction automatique : pour procéder aux mesures morphométriques, il faut avant tout transformer l'image des os observés à l'écran en objets identifiables pour l'ordinateur. Il faut pour cela contourner ces objets (les entourer d'un contour) afin d'en faire des éléments informatiques dont on pourra mesurer les caractéristiques (sélectionnées par l'opérateur au sein des paramètres offerts par le logiciel).

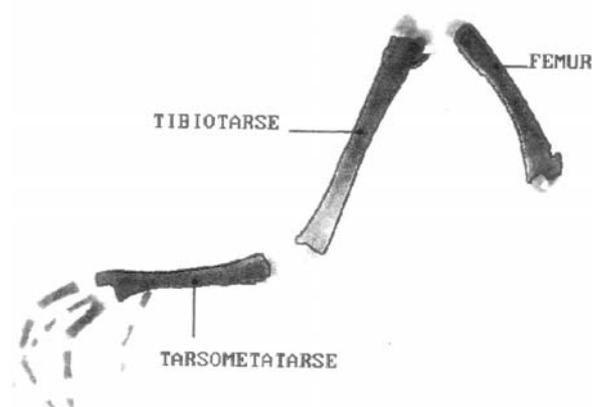


Figure 15 : membre pelvien après extraction automatique par l'ordinateur

Deux types d'extractions sont envisageables : l'extraction manuelle, qui consiste à dessiner les contours à la main à l'aide de la souris ; et l'extraction automatique qui se fait en isolant à l'écran à l'aide de la souris, un ensemble de point dont le niveau de gris moyen est juste inférieur à celui du tissu osseux. L'ordinateur contourne alors tous les points dont le niveau de gris est supérieur à celui de cet ensemble de points, ce qui décrit de façon répétable, la forme de l'os à l'écran (Fig.15).

La technique de mesure :

Nous avons choisi arbitrairement de mesurer les os du membre pelvien en incidence médiale et ceux du membre thoracique en incidence latérale. Toutes les mesures ont été faites par le même opérateur et suivant la technique décrite ci-dessous.

Le membre entier est placé dans une boîte de pétri. La boîte est posée sur le banc optique. La caméra est réglée à une hauteur de 80 cm au-dessus du banc optique et est mise au point avec le zoom réglé au maximum. Ensuite la boîte de pétri est écartée du champ de façon à étalonner l'appareil qui, initialement mesure en pixels. Pour cela, on pose une règle graduée sur le banc optique et on trace une droite à l'aide de la souris de 30 mm de long. Le logiciel convertit alors les pixels en mm. Il est prêt à travailler en mm. La boîte de pétri est alors replacée dans le champ de la caméra et les os subissent une extraction automatique de leur contour. Les paramètres morphométriques (surface, périmètre et grand diamètre de Férêt) sont sélectionnés et la mesure des os en mm (ou mm² pour les surfaces) est automatiquement faite et enregistrée dans un fichier.

B- Résultats :

1- Réitération des mesures :

Nous avons voulu voir si les mesures étaient réitératives pour un même opérateur utilisant la même technique, le même matériel mais des jours différents (étant donné que l'ensemble des mesures ne pouvaient se faire en une journée). D'autre part, nous avons voulu vérifier que les erreurs de mesure étaient négligeables devant la variabilité des os. Pour cela, nous avons mesuré cinq fois les tibiotarses droit et gauche de sept embryons témoins de l'expérience n°1. Pour chaque os, nous avons donc fait des mesures des jours différents, avec un étalonnage refait avant chaque début de mesure.

Pour chaque os, il a été noté la valeur de la surface, du grand diamètre de Férêt, du périmètre et du petit diamètre de Férêt (Annexe A : Tableau de données brutes pour la réitération des mesures et Tableau 5).

Tableau 5 : Réitération des mesures : données statistiques.

	Surface	Grand Diamètre	Périmètre	Petit Diamètre
Nb de mesures	70	70	70	70
min	17,94	12,69	30,29	1,86
max	30,93	17,24	44,95	3,91
m	22,8854286	15,5771429	37,9397143	2,46228571
SD	3,33948824	1,54127196	3,65780047	0,44993452

Ces mesures sont des variables quantitatives continues (sur le plan statistique).

Pour chacune de ces mesures, il existe des variations par rapport à la moyenne (notée m) du lot :

- variation due à l'individu mesuré, l'embryon, notée P_i
- variation due à l'os mesuré (les latérales gauche et droite ne sont pas forcément équivalentes) notée L_j
- variation due à la mesure (opérateur, différence dans l'extraction automatique...) notée E_{ijk}

Ceci peut être transcrit sous forme statistique :

$$\text{Mesure} = Y = m + P_i + L_j + (PxL)_{ij} + E_{ijk}$$

$$CV_{\text{itération}} = \frac{\sqrt{E_{ijk}}}{m}$$

$\sqrt{E_{ijk}}$ = variation dans les 5 mesures due à la technique de mesure.

m = moyenne de la variable mesurée.

E_{ijk} nous est donné lors de l'analyse de la variance faite par le logiciel SYSTAT (Tabl.6).

$CV_{\text{réitération}}$ représente le coefficient de variation qui nous permet d'évaluer l'erreur introduite par la mesure devant la moyenne du lot. Si ce coefficient est petit, les mesures sont réitératives.

Tableau 6 : Réitération des mesures : résultats de l'analyse de la variance.

Mesure en mm ou mm ²	m	E_{ijk}	$CV_{\text{réitération}}$
Surface	22.884	0.502	3.096%
Grand Diamètre	15.557	0.012	0.703%
Périmètre	37.94	0.818	2.38%
Petit Diamètre	2.462	0.133	14.8%

CONCLUSIONS :

97% de la dispersion des valeurs de la surface est expliquée par la variabilité individuelle des poulets et entre les latérales (la surface des os est en effet différente entre deux poulets différents mais aussi entre les deux pattes d'un même individu) ; seulement 3.096% de cette dispersion résulte des erreurs de mesure.

99.3% de la dispersion des valeurs du grand diamètre de Férêt est expliquée par la variabilité individuelle des poulets et entre les latérales ; seulement 0.703% de cette dispersion résulte des erreurs de mesure.

97.7% de la dispersion des valeurs du périmètre est expliquée par la variabilité individuelle des poulets et entre les latérales ; seulement 2.38% de cette dispersion résulte des erreurs de mesure.

85.2% de la dispersion des valeurs du petit diamètre de Férêt est expliquée par la variabilité individuelle des poulets et entre les latérales ; 14.8% de cette dispersion résulte des erreurs de mesure.

Donc, pour les trois premiers paramètres (périmètre, surface et grand diamètre de Férêt), les erreurs de mesures sont beaucoup moins importantes que les variations de taille entre les individus et les côtés. Pour ces trois paramètres, les mesures sont réitératives. En revanche, en

ce qui concerne le petit diamètre de Férêt, les erreurs de mesure sont importantes ce qui nous a conduit à rejeter ce paramètre morphométrique.

2- Expérience n°1 :

L'expérience n°1 regroupe différents échantillons d'embryons :

- 10 embryons témoins n'ayant subi aucun traitement ;
- 6 embryons « témoins fenêtre » issus d'œufs dont la coquille est percée aux ciseaux au niveau du petit bout (côté opposé à la chambre à air). De plus, une fenêtre de 2 cm de côté est découpée à mi-longueur entre le gros et le petit bout de l'œuf. Le trou est ensuite obstrué à l'aide de ruban adhésif placé auparavant sous lampe UV ;
- 6 embryons « témoins HCl » issus d'œufs auxquels on a fait un trou dans la coquille comme les précédents et dans lesquels on a injecté du solvant (HCl 0.1N en solution dans de l'eau distillée, 20 à 30 microlitres selon le poids de l'œuf), dans la cavité sub-germinale, sous le disque embryonnaire ;
- 5 embryons « traités » issus d'œufs auxquels on a fait un trou dans la coquille et dans lesquels on a injecté du sulfoxyde d'albendazole en solution dans le solvant (HCl 0.1N en solution dans de l'eau distillée) à la concentration de 0.001mg/ml, sous le disque embryonnaire, dans la cavité sub-germinale.

Les os du squelette appendiculaire de ces embryons ont été mesurés (surface, périmètre et grand diamètre de Férêt).

Ces 1134 mesures sont en annexe (Annexe B : Tableau de données brutes pour l'expérience n°1).

Remarque : 16 os (soit 48 mesures) n'entrent pas dans les statistiques de l'expérience n°1 pour des raisons techniques (os fracturé ou abîmé lors du transport ou présentant un défaut de coloration majeur). Nous avons préféré éliminer ces données plutôt que d'introduire une erreur de mesure. Les autres os de l'embryon sont utilisés pour l'expérience.

Des graphiques résumant les valeurs mesurées pour chaque paramètre (Annexe C : Représentation graphique expérience n°1, grand diamètre ; Annexe D : Représentation graphique expérience n°1, périmètre ; Annexe E : Représentation graphique expérience n°1, surface).

Pour chaque os, et quel que soit le paramètre mesuré, les embryons traités apparaissent plus petits en moyenne que les populations témoins (Fig.16).

Nous avons donc procédé à une analyse statistique pour voir si ces différences étaient significatives.

Remarque : pour l'analyse statistique, nous avons choisi de mesurer la droite et la gauche de chaque membre et nous avons considéré ces mesures comme indépendantes car :

- la taille d'un fémur droit et d'un fémur gauche d'un même embryon n'est pas forcément la même,
- l'effet d'un traitement sur la taille des os peut n'être visible que d'un côté (l'effet tératogène peut tout à fait aboutir à l'agénésie d'un seul membre par exemple).

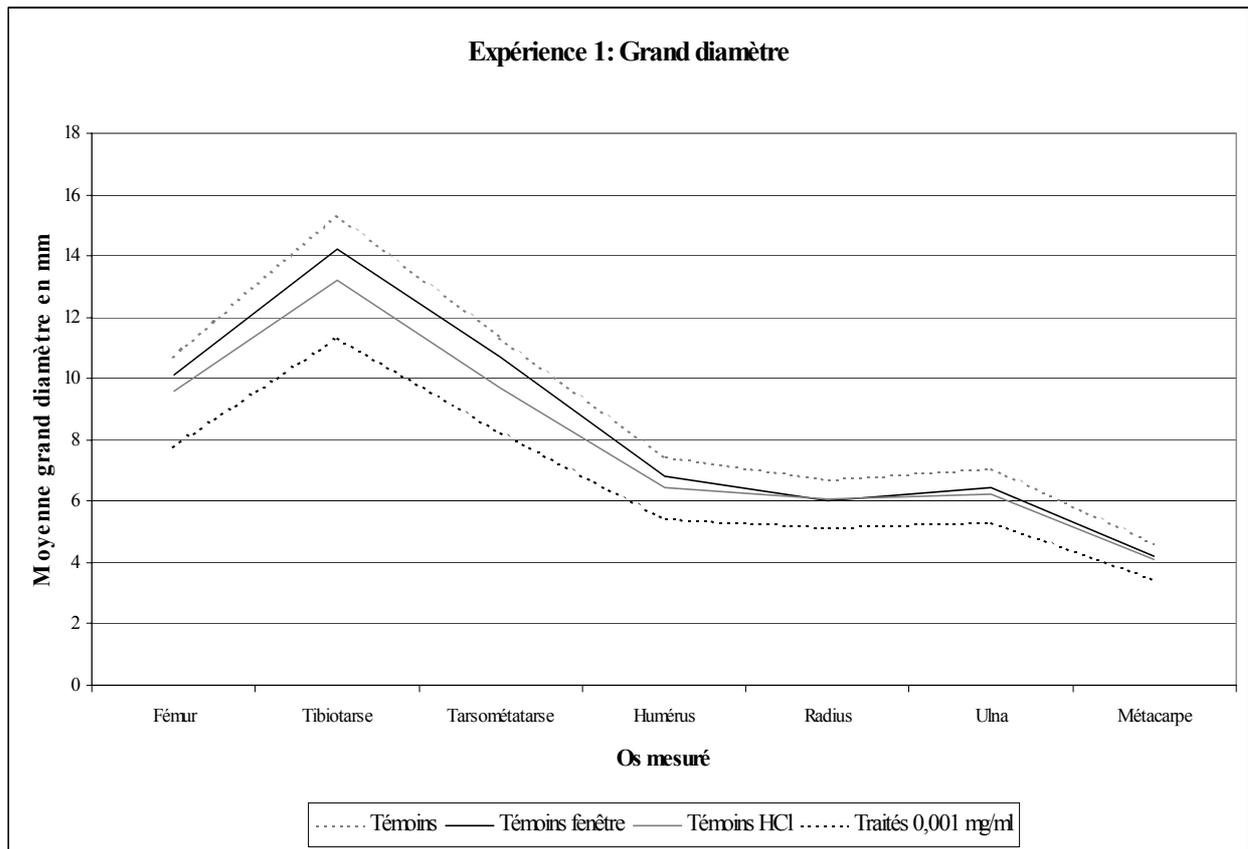


Figure 16 : représentation graphique de la taille moyenne du grand diamètre de Férêt en mm dans chaque échantillon (témoins et traités).

Nous avons ensuite recherché l'éventuel effet de ces traitements (on peut en effet considérer que le fait de percer la coquille ou d'injecter du solvant est un type de traitement bien que ces embryons soient appelés des témoins fenêtre ou HCl) sur la taille des os avec le modèle statistique suivant :

$$Y_{ijk} = m + Trt_i + P_j / Trt_i + \epsilon_{ijk}$$

Ce modèle peut s'expliquer ainsi : pour chaque mesure, Y_{ijk} , il existe des variations par rapport à la moyenne m de l'échantillon :

- des variations dues au traitement, notées Trt_i ,
- des variations dues aux individus traités, notées P_j / Trt_i ;
- des variations dues à un ensemble de facteurs (erreurs de mesures, erreurs d'extraction au cours de l'analyse d'image...), notées ϵ_{ijk} .

Une fois le modèle écrit, nous avons comparé les différents échantillons deux à deux à l'aide d'une analyse de la variance.

Notre hypothèse était la suivante :

$$H_0 : \left| m_1 - m_2 \right| < \Delta \text{ si } \Delta = \sigma \text{ (écart type dans l'échantillon considéré),}$$

avec un risque de première espèce $\alpha = 5\%$ et $\sigma = \max(\sigma_1, \sigma_2)$

$$\text{Contre } H_1 : \left| m_1 - m_2 \right| > \Delta$$

Pour chaque comparaison, le logiciel (SYSTAT) effectue une analyse de la variance et calcule une valeur de p.

La règle de décision est la suivante :

- si $p < \alpha$, on rejette l'hypothèse H_0 au risque de première espèce $\alpha = 5\%$. Ceci peut se traduire par : l'écart entre les moyennes des deux échantillons est plus grand que le plus grand écart que je peux observer entre deux mesures dans un même échantillon. Donc l'écart observé entre les deux moyennes ne s'explique pas que par la variabilité individuelle des poulets mais par le traitement et donc je conclus avec un risque de 5% de me tromper que le traitement a un effet sur la moyenne des mesures.

- si $p > \alpha$, on accepte H_0 au risque de seconde espèce β . L'écart entre les deux moyennes n'est pas plus grand que le plus grand écart que je peux observer entre deux mesures du même échantillon. L'effet du traitement ne peut pas être mis en évidence puisqu'il ne fait pas varier la moyenne plus que le facteur individu. Ainsi je conclus que le traitement n'a pas d'effet (ou plutôt que je ne vois pas l'effet du traitement compte tenu de la variabilité individuelle des mesures) au risque de seconde espèce β .

Le risque β sera calculé avec la formule suivante :

$$U_{1-\beta} = \sqrt{n/2} - 1.96$$

Avec n = effectif le plus petit des deux échantillons et $U \sim N(0,1)$

Les résultats des analyses de la variance pour chaque os et pour chaque paramètre figurent dans le tableau 7.

Tableau 7 : Résultats de l'analyse de la variance de l'expérience n°1

OS	Paramètre mesuré	Témoins =		Témoins =		Témoins fenêtré		Témoins fenêtré =		Témoins fenêtré =		Témoins HCl =	
		Traités 0.001mg/ml		Témoins HCl		Témoins HCl		Témoins HCl		Traités 0.001 mg/ml		Traités 0.001 mg/ml	
FEMUR	Gd diamètre	Non (0.002) %	Oui (0.457) ♣	Oui (0.158) ♣	Oui (0.536) ♣	Non (0.019) %	Oui (0.066) ♣	Non (0.019) %	Oui (0.066) ♣	Non (0.019) %	Oui (0.066) ♣	Non (0.019) %	Oui (0.066) ♣
	Périmètre	Non (0.001) %	Oui (0.327) ♣	Oui (0.108) ♣	Oui (0.555) ♣	Non (0.018) %	Oui (0.061) ♣	Non (0.018) %	Oui (0.061) ♣	Non (0.018) %	Oui (0.061) ♣	Non (0.018) %	Oui (0.061) ♣
	Surface	Non (0.006) %	Oui (0.504) ♣	Oui (0.238) ♣	Oui (0.639) ♣	Non (0.04) %	Oui (0.098) ♣	Non (0.04) %	Oui (0.098) ♣	Non (0.04) %	Oui (0.098) ♣	Non (0.04) %	Oui (0.098) ♣
TIBIOTARSE	Gd diamètre	Non (0.003) %	Oui (0.482) ♣	Oui (0.096) ♣	Oui (0.353) ♣	Non (0.019) %	Oui (0.112) ♦	Non (0.019) %	Oui (0.112) ♦	Non (0.019) %	Oui (0.112) ♦	Non (0.019) %	Oui (0.112) ♦
	Périmètre	Non (0.002) %	Oui (0.686) ♣	Oui (0.157) ♣	Oui (0.338) ♣	Non (0.007) %	Oui (0.051) ♦	Non (0.007) %	Oui (0.051) ♦	Non (0.007) %	Oui (0.051) ♦	Non (0.007) %	Oui (0.051) ♦
	Surface	Non (0.004) %	Oui (0.602) ♣	Oui (0.149) ♣	Oui (0.379) ♣	Non (0.017) %	Oui (0.091) ♦	Non (0.017) %	Oui (0.091) ♦	Non (0.017) %	Oui (0.091) ♦	Non (0.017) %	Oui (0.091) ♦
TARSOMETATA-TARSE	Gd diamètre	Non (0.002) %	Oui (0.581) ♣	Oui (0.079) ♣	Oui (0.255) ♣	Non (0.013) %	Oui (0.127) ♣	Non (0.013) %	Oui (0.127) ♣	Non (0.013) %	Oui (0.127) ♣	Non (0.013) %	Oui (0.127) ♣
	Périmètre	Non (0.03) %	Oui (0.619) ♣	Oui (0.124) ♣	Oui (0.329) ♣	Non (0.017) %	Oui (0.121) ♣	Non (0.017) %	Oui (0.121) ♣	Non (0.017) %	Oui (0.121) ♣	Non (0.017) %	Oui (0.121) ♣
	Surface	Non (0.012) %	Oui (0.366) ♣	Oui (0.235) ♣	Oui (0.788) ♣	Oui (0.104) ♣	Oui (0.165) ♣	Oui (0.104) ♣	Oui (0.165) ♣	Oui (0.104) ♣	Oui (0.165) ♣	Oui (0.104) ♣	Oui (0.165) ♣
HUMERUS	Gd diamètre	Non (0.000) %	Oui (0.183) ♣	Non (0.04) %	Oui (0.471) ♣	Non (0.013) %	Oui (0.056) ♣	Non (0.013) %	Oui (0.056) ♣	Non (0.013) %	Oui (0.056) ♣	Non (0.013) %	Oui (0.056) ♣
	Périmètre	Non (0.000) %	Oui (0.154) ♣	Non (0.025) %	Oui (0.405) ♣	Non (0.012) %	Oui (0.068) ♣	Non (0.012) %	Oui (0.068) ♣	Non (0.012) %	Oui (0.068) ♣	Non (0.012) %	Oui (0.068) ♣
	Surface	Non (0.001) %	Oui (0.216) ♣	Non (0.018) %	Oui (0.257) ♣	Non (0.02) %	Oui (0.175) ♣	Non (0.02) %	Oui (0.175) ♣	Non (0.02) %	Oui (0.175) ♣	Non (0.02) %	Oui (0.175) ♣
RADIUS	Gd diamètre	Non (0.000) %	Non (0.046) %	Oui (0.064) ♣	Oui (0.881) ♣	Non (0.03) %	Non (0.022) %	Non (0.03) %	Non (0.022) %	Non (0.03) %	Non (0.022) %	Non (0.03) %	Non (0.022) %
	Périmètre	Non (0.000) %	Oui (0.053) ♣	Non (0.041) %	Oui (0.909) ♣	Non (0.034) %	Non (0.043) %	Non (0.034) %	Non (0.043) %	Non (0.034) %	Non (0.043) %	Non (0.034) %	Non (0.043) %
	Surface	Non (0.002) %	Non (0.044) %	Oui (0.065) ♣	Oui (0.857) ♣	Oui (0.173) ♣	Oui (0.128) ♣	Oui (0.173) ♣	Oui (0.128) ♣	Oui (0.173) ♣	Oui (0.128) ♣	Oui (0.173) ♣	Oui (0.128) ♣
ULNA	Gd diamètre	Non (0.000) %	Oui (0.114) ♣	Non (0.033) %	Oui (0.562) ♣	Non (0.012) %	Non (0.041) %	Non (0.012) %	Non (0.041) %	Non (0.012) %	Non (0.041) %	Non (0.012) %	Non (0.041) %
	Périmètre	Non (0.000) %	Oui (0.092) ♣	Non (0.018) %	Oui (0.472) ♣	Non (0.020) %	Oui (0.084) ♣	Non (0.020) %	Oui (0.084) ♣	Non (0.020) %	Oui (0.084) ♣	Non (0.020) %	Oui (0.084) ♣
	Surface	Non (0.000) %	Oui (0.130) ♣	Non (0.025) %	Oui (0.446) ♣	Non (0.022) %	Oui (0.097) ♣	Non (0.022) %	Oui (0.097) ♣	Non (0.022) %	Oui (0.097) ♣	Non (0.022) %	Oui (0.097) ♣
METACARPE	Gd diamètre	Non (0.001) %	Oui (0.268) ♥	Oui (0.088) ♣	Oui (0.598) ♥	Non (0.027) %	Oui (0.066) ♣	Non (0.027) %	Oui (0.066) ♣	Non (0.027) %	Oui (0.066) ♣	Non (0.027) %	Oui (0.066) ♣
	Périmètre	Non (0.001) %	Oui (0.25) ♥	Non (0.038) %	Oui (0.396) ♥	Non (0.033) %	Oui (0.148) ♣	Non (0.033) %	Oui (0.148) ♣	Non (0.033) %	Oui (0.148) ♣	Non (0.033) %	Oui (0.148) ♣
	Surface	Non (0.001) %	Oui (0.129) ♥	Non (0.011) %	Oui (0.325) ♥	Non (0.044) %	Oui (0.247) ♣	Non (0.044) %	Oui (0.247) ♣	Non (0.044) %	Oui (0.247) ♣	Non (0.044) %	Oui (0.247) ♣

Rq : entre parenthèses figure la valeur de p ; ♣ : $\beta=31\%$; ♠ : $\beta=39\%$; ♦ : $\beta=43.6\%$; ♥ : $\beta=35\%$; % : $\alpha=5\%$

On voit que lorsque l'on conclut à un effet du traitement (noté « Non » dans le tableau avec $p < 0.05$), le risque de se tromper est faible, c'est celui de première espèce, $\alpha = 5\%$. Par contre quand on conclut à l'égalité des moyennes c'est-à-dire à aucun effet visible du traitement (noté « Oui » dans le tableau avec $p > 0.05$), le risque de se tromper est beaucoup plus grand, c'est celui de seconde espèce, β , qui dépend du nombre d'individus des échantillons. Or nous ne disposons pas de beaucoup d'embryons ce qui explique pourquoi β varie entre 31 et 43,6%.

Les conclusions de ces multiples analyses de la variance sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Résumé et conclusions des diverses analyses de la variance faites lors de l'expérience n°1.

OS	PARAMETRE MESURE	CONCLUSION
FEMUR	Gd diamètre	Il n'existe pas de différence significative entre les différents lots de témoins (témoins, témoins fenêtre et témoins HCl).
	Périmètre	
	Surface	
TIBIOTARSE	Gd diamètre	Il existe une différence significative entre les témoins et les traités et entre les témoins fenêtre et les traités. Il n'existe pas de différence significative entre les témoins HCl et les traités.
	Périmètre	
	Surface	
TARSOMETATARSE	Gd diamètre	☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.
	Périmètre	
	Surface	Il n'existe pas de différence significative entre les différents lots de témoins (témoins, témoins fenêtre et témoins HCl).
		Il existe une différence significative entre les témoins et les traités. Il n'existe pas de différence significative entre les témoins fenêtre et les traités et entre les témoins HCl et les traités. ☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.
HUMERUS	Gd diamètre	Il n'existe pas de différence significative entre les différents lots de témoins (témoins, témoins fenêtre et témoins HCl). Il existe une différence significative entre les témoins et les traités et entre les témoins fenêtre et les traités. Il n'existe pas de différence significative entre les témoins HCl et les traités. ☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.
	Périmètre	
	Surface	

RADIUS	Gd diamètre	<p>Il n'existe pas de différence significative entre les témoins et les témoins HCl et entre les témoins fenêtre et les témoins HCl.</p> <p>Il existe une différence significative entre les témoins et les traités ; entre les témoins et les témoins fenêtre ; entre les témoins fenêtre et les traités et entre les témoins HCl et les traités.</p> <p>☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.</p>
	Périmètre	<p>Il n'existe pas de différence significative entre les témoins et les témoins fenêtre et entre les témoins fenêtre et les témoins HCl.</p> <p>Il existe une différence significative entre les témoins et les traités ; entre les témoins et les témoins HCl ; entre les témoins fenêtre et les traités et entre les témoins HCl et les traités.</p> <p>☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.</p>
	Surface	<p>Il n'existe pas de différence significative entre les témoins et les témoins HCl ; entre les témoins fenêtre et les témoins HCl ; entre les témoins fenêtre et les traités et entre les témoins HCl et les traités.</p> <p>Il existe une différence significative entre les témoins et les traités ; entre les témoins et les témoins fenêtre.</p> <p>☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.</p>
ULNA	Gd diamètre	<p>Il n'existe pas de différence significative entre les témoins et les témoins fenêtre ; entre les témoins fenêtre et les témoins HCl.</p> <p>Il existe une différence significative entre les témoins et les traités ; entre les témoins et les témoins HCl ; entre les témoins fenêtre et les traités et entre les témoins HCl et les traités.</p> <p>☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.</p>
	Périmètre Surface	<p>Il n'existe pas de différence significative entre les différents lots de témoins (témoins, témoins fenêtre et témoins HCl).</p>
METACARPE	Gd diamètre	<p>Il existe une différence significative entre les témoins et les traités et entre les témoins fenêtre et les traités.</p> <p>Il n'existe pas de différence significative entre les témoins HCl et les traités.</p> <p>☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.</p>

METACARPE	Périmètre	Il n'existe pas de différence significative entre les témoins et les témoins fenêtré ; entre les témoins fenêtré et les témoins HCl et entre les témoins HCl et les traités. Il existe une différence significative entre les témoins et les traités ; entre les témoins et les témoins HCl et entre les témoins fenêtré et les traités.
	Surface	☞ Nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, à lui seul, a un effet sur la mesure de ces os.

Quel que soit l'os mesuré et le paramètre de mesure choisi, on conclut toujours à une différence significative entre les témoins et les traités. Mais cette différence est la somme des effets de trois traitements (le trou, le solvant et le sulfoxyde d'albendazole). Pour démontrer l'effet du seul sulfoxyde d'albendazole, il faudrait trouver une différence significative entre les témoins HCl et les traités associée à une absence de différence significative entre les différents témoins ; ce qui ne fut jamais le cas dans cette expérience.

Certes, dans tous les cas, nous avons trouvé une différence significative entre les traités et les témoins, et, dans quelques cas, nous avons trouvé une différence significative entre les témoins HCl et les traités (Radius : grand diamètre et périmètre ; Ulna : grand diamètre) ; mais cela n'est pas suffisant (compte tenu sûrement de nos tailles d'échantillons) pour mettre en évidence l'effet du seul sulfoxyde d'albendazole sur la taille de ces os.

Par contre, dans tous les cas, nous n'observons pas de différence significative entre les témoins fenêtré et les témoins HCl. Ceci signifie, avec un risque d'erreur de seconde espèce β certes supérieur à 5%, que nous pouvons raisonnablement supposer que l'action du HCl dans nos conditions expérimentales est minime, par rapport à celle du sulfoxyde d'albendazole sur la taille des os. Ceci vient confirmer ce que suggérait déjà la simple analyse des représentations graphiques des mesures (Annexe C : Représentation graphique expérience n°1, grand diamètre ; Annexe D : Représentation graphique expérience n°1, périmètre ; Annexe E : Représentation graphique expérience n°1, surface).

Conclusion :

☞ **Dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons pas conclure que le sulfoxyde d'albendazole, seul, a un effet sur la taille des os du squelette des membres de l'embryon de poulet. Par contre, nous pouvons constater que son action vient s'ajouter à celle du HCl et qu'elle est prépondérante.**

2- Expérience n°2 :

L'expérience n°2 regroupe différents échantillons d'embryons :

- 9 embryons « témoins fenêtre » issus d'œufs dont la coquille est percée aux ciseaux au niveau du petit bout (côté opposé à la chambre à air). De plus, une fenêtre de 2 cm de côté est découpée à mi-longueur entre le gros et le petit bout de l'œuf. Le trou est ensuite obstrué à l'aide de ruban adhésif placé auparavant sous lampe UV ;
- 4 embryons « témoins HCl » issus d'œufs auxquels on a fait un trou dans la coquille comme les précédents et dans lesquels on a injecté du solvant (HCl 0.1N en solution dans de l'eau distillée, 20 à 30 microlitres selon le poids de l'œuf), dans la cavité sub-germinale, sous le disque embryonnaire ;
- 3 embryons « traités 0.1 mg/ml » issus d'œufs auxquels on a fait un trou dans la coquille et dans lesquels on a injecté du sulfoxyde d'albendazole en solution dans le solvant (HCl 0.1N en solution dans de l'eau distillée) à la concentration de 0.1mg/ml, sous le disque embryonnaire, dans la cavité sub-germinale.
- 8 embryons « traités 0.01 mg/ml » issus d'œufs auxquels on a fait un trou dans la coquille et dans lesquels on a injecté du sulfoxyde d'albendazole en solution dans le solvant (HCl 0.1N en solution dans de l'eau distillée) à la concentration de 0.01mg/ml, sous le disque embryonnaire, dans la cavité sub-germinale.

Dans cette expérience deux concentrations en sulfoxyde d'albendazole ont été testées (0.01 et 0.1 mg/ml).

- 0.001 mg/ml permettrait d'approcher la concentration retrouvée dans le plasma d'agneaux (1,6 µg/ml) dont les mères ont reçu 20 mg/kg de nétohimin (une prodrogue de l'albendazole) au 17^{ème} jour de gestation. Cette concentration entraîne des malformations chez l'agneau (Navarro *et al.*, 1997 ; Fabre *et al.*, 1989 ; Navarro *et al.*, 1998 ; Cristofol *et al.*, 1995).

- donc 0.01 et 0.1 mg/ml représentent respectivement 10 et 100 fois cette concentration supposée toxique.

Les os du squelette appendiculaire de ces embryons ont été mesurés (surface, périmètre et grand diamètre de Férêt).

Ces 1008 mesures sont en annexe (Annexe F : Tableau de données brutes pour l'expérience n°2).

Remarque : 13 os (soient 39 mesures) n'entrent pas dans les statistiques de l'expérience n°2 pour des raisons techniques (os fracturé ou abîmé lors du transport ou présentant un défaut de coloration majeur). Nous avons préféré éliminer ces données plutôt que d'introduire une erreur de mesure. Les autres os de l'embryon sont utilisés pour l'expérience.

Des graphiques résument les valeurs mesurées pour chaque paramètre (Annexe G : Représentation graphique expérience n°2, grand diamètre ; Annexe H : Représentation graphique expérience n°2, périmètre ; Annexe I : Représentation graphique expérience n°2, surface).

Nous avons utilisé le même modèle statistique que pour l'expérience n°1 pour évaluer l'effet des traitements sur ces mesures.

Les résultats des analyses de la variance pour chaque os et pour chaque paramètre figurent dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats de l'analyse de la variance de l'expérience n°2.

OS	PARAMETRE MESURE	Témoins fenêtre = Témoins HCl		Témoins fenêtre = Témoins 0.1 mg/ml		Témoins HCl = Témoins 0.1 mg/ml		Témoins HCl = Témoins 0.01 mg/ml		Témoins HCl = Témoins 0.1 mg/ml	
FEMUR	Gd diamètre	0.860 ♣	0.262 ♦	0.490 ♥	0.397 ♦	0.471 ♣	0.116 ♦				
	Périmètre	0.860 ♣	0.210 ♦	0.543 ♥	0.333 ♦	0.513 ♣	0.101 ♦				
	Surface	0.958 ♣	0.336 ♦	0.685 ♥	0.423 ♦	0.709 ♣	0.220 ♦				
TIBIOTARSE	Gd diamètre	0.876 ♣	0.331 ♦	0.468 ♥	0.464 ♦	0.467 ♣	0.146 ♦				
	Périmètre	0.974 ♣	0.355 ♦	0.393 ♥	0.403 ♦	0.517 ♣	0.135 ♦				
	Surface	0.812 ♣	0.577 ♦	0.396 ♥	0.502 ♦	0.656 ♣	0.251 ♦				
TARSOMETATA -TARSE	Gd diamètre	0.977 ♣	0.489 ♦	0.292 ♥	0.561 ♦	0.385 ♣	0.157 ♦				
	Périmètre	0.714 ♣	0.789 ♦	0.160 ♥	0.603 ♦	0.437 ♣	0.204 ♦				
	Surface	0.500 ♣	0.852 ♦	0.193 ♥	0.711 ♦	0.696 ♣	0.444 ♦				
HUMERUS	Gd diamètre	0.728 ♦	0.391 ♦	0.384 ♠	0.673 ♦	0.334 ♦	0.150 ♦				
	Périmètre	0.505 ♦	0.331 ♦	0.577 ♠	0.798 ♦	0.297 ♦	0.184 ♦				
	Surface	0.916 ♦	0.599 ♦	0.970 ♠	0.606 ♦	0.940 ♦	0.592 ♦				
RADIUS	Gd diamètre	0.660 ♦	0.354 ♦	0.550 ♠	0.686 ♦	0.392 ♦	0.189 ♦				
	Périmètre	0.722 ♦	0.417 ♦	0.466 ♠	0.706 ♦	0.384 ♦	0.194 ♦				
	Surface	0.348 ♦	0.418 ♦	0.927 ♠	0.915 ♦	0.330 ♦	0.395 ♦				
ULNA	Gd diamètre	0.810 ♦	0.321 ♦	0.554 ♠	0.534 ♦	0.508 ♦	0.170 ♦				
	Périmètre	0.779 ♦	0.412 ♦	0.563 ♠	0.656 ♦	0.490 ♦	0.230 ♦				
	Surface	0.592 ♦	0.459 ♦	0.801 ♠	0.866 ♦	0.484 ♦	0.370 ♦				
METACARPE	Gd diamètre	0.829 ♦	0.908 ♦	0.566 %	0.934 ♦	0.832 ♦	0.757 ♦				
	Périmètre	0.978 ♦	0.896 ♦	0.624 %	0.933 ♦	0.740 ♦	0.816 ♦				
	Surface	0.724 ♦	0.793 ♦	0.962 %	0.941 ♦	0.760 ♦	0.827 ♦				

Rq : dans le tableau figure la valeur de p ; ♣ : β = 48.4% ; ♦ : β = 19.3% ; ♠ : β = 21.8% ; % : β = 24.6%

Quel que soit le paramètre choisi et l'os mesuré, aucune différence significative n'a pu être observée entre les différents groupes d'embryons (p est toujours supérieur à 0.05). L'écart entre les moyennes des différents échantillons n'est pas plus grand que le plus grand écart que l'on peut observer entre deux mesures du même échantillon. Ainsi l'effet du traitement ne peut être mis en évidence compte tenu de la variabilité individuelle des mesures.

Remarque : encore une fois, le risque β de se tromper en disant que l'action du sulfoxyde d'albendazole est sans conséquence sur le squelette est très grand, compte tenu de la taille des échantillons.

Conclusion :

☞ Dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons rien conclure quant aux conséquences de l'utilisation du sulfoxyde d'albendazole sur la taille des os du squelette appendiculaire de l'embryon de poulet.

3- Expérience n°3 :

L'expérience n°3 regroupe différents échantillons d'embryons :

- 7 embryons « témoins fenêtre » issus d'œufs dont la coquille est percée aux ciseaux au niveau du petit bout (côté opposé à la chambre à air). De plus, une fenêtre de 2 cm de côté est découpée à mi-longueur entre le gros et le petit bout de l'œuf. Le trou est ensuite obstrué à l'aide de ruban adhésif placé auparavant sous lampe UV ;
- 5 embryons « témoins HCl » issus d'œufs auxquels on a fait un trou dans la coquille comme les précédents et dans lesquels on a injecté du solvant (HCl 0.1N en solution dans de l'eau distillée, 20 à 30 microlitres selon le poids de l'œuf), dans la cavité sub-germinale, sous le disque embryonnaire ;
- 4 embryons « traités 0.001 mg/ml » issus d'œufs auxquels on a fait un trou dans la coquille et dans lesquels on a injecté du sulfoxyde d'albendazole en solution dans le solvant (HCl 0.1N en solution dans de l'eau distillée) à la concentration de 0.001mg/ml, sous le disque embryonnaire, sans la cavité sub-germinale.
- 6 embryons « traités 1 mg/ml » issus d'œufs auxquels on a fait un trou dans la coquille et dans lesquels on a injecté du sulfoxyde d'albendazole en solution dans le solvant (HCl 0.1N en solution dans de l'eau distillée) à la concentration de 1 mg/ml, sous le disque embryonnaire, sans la cavité sub-germinale.

Dans cette expérience deux concentrations en sulfoxyde d'albendazole ont été testées.

- 0.001 mg/ml permettrait d'approcher la concentration retrouvée dans le plasma d'agneaux (1,6 $\mu\text{g/ml}$) dont les mères ont reçu 20 mg/kg de nétohimin (une prodrogue de l'albendazole) au 17^{ème} jour de gestation. Cette concentration entraîne des malformations chez l'agneau (Navarro *et al.*, 1997 ; Fabre *et al.*, 1989 ; Navarro *et al.*, 1998 ; Cristofol *et al.*, 1995).

- 1 mg/ml : qui représente 1000 fois la concentration précédente.

Les os du squelette appendiculaire de ces embryons ont été mesurés (surface, périmètre et grand diamètre de Férêt).

Ces 924 mesures sont en annexe (Annexe J : Tableau de données brutes pour l'expérience n°3).

Remarque : 2 os (soient 6 mesures) n'entrent pas dans les statistiques de l'expérience n°3 pour des raisons techniques (os fracturé ou abîmé lors du transport ou présentant un défaut de coloration majeur). Nous avons préféré éliminer ces données plutôt que d'introduire une erreur de mesure. Les autres os de l'embryon sont utilisés pour l'expérience.

Des graphiques résument les valeurs mesurées pour chaque paramètre (Annexe K : Représentation graphique expérience n°3, grand diamètre ; Annexe L : Représentation graphique expérience n°3, périmètre ; Annexe M : Représentation graphique expérience n°3, surface).

Nous avons utilisé le même modèle statistique que pour l'expérience n°1 et 2 pour évaluer l'effet des traitements sur ces mesures.

Les résultats des analyses de la variance pour chaque os et pour chaque paramètre figurent dans le tableau 10.

Quel que soit le paramètre choisi et l'os mesuré, aucune différence significative n'a pu être observée entre les différents groupes d'embryons (p est toujours supérieur à 0.05). L'écart entre les moyennes des différents échantillons n'est pas plus grand que le plus grand écart que l'on peut observer entre deux mesures du même échantillon. Ainsi l'effet du traitement ne peut être mis en évidence compte tenu de la variabilité individuelle des mesures.

Remarque : encore une fois, le risque β de se tromper en disant que l'action du sulfoxyde d'albendazole est sans conséquence sur le squelette est très grand, compte tenu de la taille des échantillons.

Conclusion :

☞ Dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons rien conclure quant aux conséquences de l'utilisation du sulfoxyde d'albendazole sur la taille des os du squelette appendiculaire de l'embryon de poulet.

Tableau 10 : Résultats de l'analyse de la variance de l'expérience n°3.

OS	PARAMETRE MESURE	Témoins fenêtre =		Témoins fenêtre =		Témoins HCl =		Témoins HCl =		Témoins HCl =	
		Traités 1 mg/ml	Témoins HCl	Traités 0.001 mg/ml	Traités 0.001 mg/ml	Traités 0.001 mg/ml	Traités 1 mg/ml	Traités 1 mg/ml	Traités 0.001 mg/ml	Traités 1 mg/ml	Traités 1 mg/ml
FEMUR	Gd diamètre	0.499 ♣	0.978 ♦	0.350 ♥	0.369 ♥	0.552 ♦	0.144 ♥				
	Périmètre	0.554 ♣	0.926 ♦	0.411 ♥	0.397 ♥	0.639 ♦	0.194 ♥				
	Surface	0.913 ♣	0.788 ♦	0.435 ♥	0.338 ♥	0.873 ♦	0.395 ♥				
TIBIOTARSE	Gd diamètre	0.432 ♣	0.794 ♦	0.459 ♥	0.361 ♥	0.635 ♦	0.171 ♥				
	Périmètre	0.468 ♣	0.852 ♦	0.440 ♥	0.378 ♥	0.624 ♦	0.177 ♥				
	Surface	0.710 ♣	0.974 ♦	0.291 ♥	0.336 ♥	0.709 ♦	0.184 ♥				
TARSOMETATA-RARSE	Gd diamètre	0.470 ♣	0.848 ♦	0.404 ♥	0.538 ♥	0.398 ♦	0.160 ♥				
	Périmètre	0.557 ♣	0.778 ♦	0.362 ♥	0.540 ♥	0.419 ♦	0.171 ♥				
	Surface	0.677 ♣	0.629 ♦	0.419 ♥	0.735 ♥	0.399 ♦	0.258 ♥				
HUMERUS	Gd diamètre	0.741 ♣	0.936 ♦	0.312 ♥	0.311 ♥	0.822 ♦	0.211 ♥				
	Périmètre	0.936 ♣	0.797 ♦	0.199 ♥	0.158 ♥	0.861 ♦	0.189 ♥				
	Surface	0.873 ♣	0.280 ♦	0.308 ♥	0.066 ♥	0.236 ♦	0.391 ♥				
RADIUS	Gd diamètre	0.880 ♣	0.823 ♦	0.131 ♥	0.205 ♥	0.936 ♦	0.167 ♥				
	Périmètre	0.851 ♣	0.973 ♦	0.161 ♥	0.188 ♥	0.885 ♦	0.215 ♥				
	Surface	0.338 ♣	0.939 ♦	0.180 ♥	0.222 ♥	0.403 ♦	0.615 ♥				
ULNA	Gd diamètre	0.966 ♣	0.843 ♦	0.257 ♣	0.360 ♣	0.817 ♦	0.255 ♣				
	Périmètre	0.988 ♣	0.894 ♦	0.284 ♣	0.364 ♣	0.886 ♦	0.290 ♣				
	Surface	0.694 ♣	0.772 ♦	0.168 ♣	0.280 ♣	0.935 ♦	0.295 ♣				
METACARPE	Gd diamètre	0.446 ♣	0.674 ♦	0.176 ♥	0.359 ♥	0.766 ♦	0.496 ♥				
	Périmètre	0.498 ♣	0.888 ♦	0.203 ♥	0.281 ♥	0.625 ♦	0.500 ♥				
	Surface	0.452 ♣	0.847 ♦	0.521 ♥	0.665 ♥	0.612 ♦	0.978 ♥				

Rq : dans le tableau figure la valeur de p ; ♣ : $\beta = 31\%$; ♦ : $\beta = 48.4\%$; ♥ : $\beta = 39.2\%$; ♠ : $\beta = 53.5\%$

III- DISCUSSION :

A- Discussion de la synthèse bibliographique :

1- La pérennisation des erreurs scientifiques :

La science avance par paliers ; chaque palier est représenté par une démarche expérimentale et par la publication scientifique qui s'y rapporte. Ainsi, la somme des publications scientifiques disponibles sur un sujet matérialise les connaissances acquises dans ce domaine. Malheureusement, il peut s'avérer qu'une publication soit inexacte, ce qui, en soi, n'est pas très grave mais pour le sujet sur lequel elle porte, peut nuire. Car cette publication peut être reprise par les auteurs suivants sur le sujet, et l'erreur est donc pérennisée.

Au cours de notre synthèse bibliographique, nous avons pu lire de nombreuses données contradictoires, et bien souvent, nous n'avions pas les moyens de trancher entre les deux versions, si bien que des recherches complémentaires s'avéraient nécessaires afin de bien cerner notre sujet.

Deux cas de pérennisation d'erreurs nous ont surpris : celui du SKF-525-A dans l'étude de l'albendazole et le cas de la loi biogénétique d'Haeckel réfuté par Richardson.

Dans l'étude du pouvoir embryotoxique de l'albendazole, l'attribution du pouvoir tératogène au sulfoxyde ou à la molécule parentale était incertaine. Certains étaient partisans de l'innocuité de la molécule parentale et ont voulu le démontrer par l'utilisation de SKF-525-A, un inhibiteur des oxydations microsomales. L'administration de cet inhibiteur devait permettre d'atteindre de fortes concentrations plasmatiques en albendazole (vu que la transformation d'albendazole en sulfoxyde était inhibée) et donc de juger du pouvoir tératogène de la molécule parentale. Il s'est avéré que l'administration de SKF-525-A abolissait le pouvoir tératogène de l'albendazole. En effet, lors de l'utilisation de cet inhibiteur, l'administration d'albendazole pendant la gestation n'entraînait plus de malformations. La conclusion fut que l'albendazole n'était pas embryotoxique par lui-même mais par le biais de son métabolite le sulfoxyde d'albendazole.

Or en 1984, Delatour *et al.*, ont démontré que l'abolition du pouvoir tératogène de l'albendazole par le SKF-525-A n'était pas due à l'innocuité de l'albendazole mais à une inhibition de l'absorption de l'albendazole et donc une diminution de la biodisponibilité du sulfoxyde d'albendazole. De plus, en 1986, Fargetton *et al.*, ont démontré que la biotransformation de l'albendazole en sulfoxyde ne pouvait être inhibée par le SKF-525-A car elle était en fait dépendante d'une monooxygénase FAD (insensible au SKF-525-A) et non cytochrome P450 dépendante (sensible au SKF-525-A).

Enfin, depuis Whittaker *et al.*, 1991 et Solana *et al.*, 1996 ont démontré que l'albendazole était beaucoup plus embryotoxique que son métabolite le sulfoxyde d'albendazole.

Malgré l'ensemble de ces recherches qui ont fait progresser pas à pas la connaissance du pouvoir embryotoxique de l'albendazole, on retrouve dans la littérature en 1989 et 1993 reprise la thèse selon laquelle l'albendazole n'est pas embryotoxique, seul le sulfoxyde d'albendazole l'est.

Un autre cas de pérennisation de l'erreur scientifique est celui de la loi biogénétique d'Haeckel. A la fin du XIX^{ème} siècle, les biologistes, dont Haeckel fut le chef de file, pensaient que tous les embryons passaient par un stade précoce identique, le stade phylotypique, et que les différences interspécifiques apparaissaient ultérieurement. Cette théorie soutenait que l'embryogenèse est un condensé de l'évolution. Haeckel avançait même dans sa loi biogénétique que le développement des mammifères contenait dans ses lignes générales le développement des oiseaux. Cette théorie a été remise en cause dernièrement par

Michael Richardson, professeur d'anatomie et de biologie du développement à la faculté de Médecine de l'Hôpital Saint George à Londres. A la suite des découvertes de Jonathan Slack et ses collègues de l'Université de Bath sur le conservatisme génétique du développement, Richardson a voulu retrouver le stade phylotypique décrit par Haeckel. Il s'est aperçu que Haeckel avait falsifié ses dessins et que « les embryons identiques d'Haeckel n'ont existé que dans les livres » (Richardson, 1998 ; Richardson *et al.*, 1997). Or il est surprenant de voir que pendant des siècles et même dans des publications récentes, on cite Haeckel ou le stade phylotypique.

La recherche scientifique n'est qu'une suite de réfutations d'erreurs, souvent on considère comme vrai ce qui ne peut pas être démontré comme étant faux... Cela dit, lorsque des publications récentes « abrogent » des théories, il est bon d'en tenir compte et dommage de voir que des erreurs sont citées postérieurement à ces démonstrations correctrices.

2- Les benzimidazoles : une classe pharmaceutique déchuée ou des antiparasitaires en puissance ?

Le pouvoir tératogène de la classe des benzimidazoles existe et quel que soit le représentant de la classe que l'on étudie, on peut le trouver. A côté des benzimidazoles, d'autres classes pharmaceutiques également antiparasitaires ne présentent pas cette toxicité. Donc pourquoi continuer la recherche sur les benzimidazoles et ne pas tout simplement abandonner cette classe pharmaceutique ? Ne va-t-on pas assister à un déclin voire un abandon de cette classe au profit des ivermectines par exemple ?

Même si le pouvoir tératogène des benzimidazoles existe, tout dépend de la dose utilisée. Pour l'albendazole par exemple il faut dépasser les doses thérapeutiques pour étudier le pouvoir tératogène de la molécule. Pour le nétopim, la dose dicrocélicide de 20 mg/kg est embryotoxique et pourtant il est toujours utilisé en médecine vétérinaire.

Est-ce une volonté de garder toute notre palette thérapeutique que de ne pas abandonner cette classe pharmaceutique ? Est-ce parce que les résistances aux ivermectines sont de plus en plus fréquentes que l'on garde la classe des benzimidazoles et que l'on continue les recherches sur l'oxfendazole par exemple ?

La suppression en France de l'autorisation de mise sur le marché des produits contenant du bithionoloxyle ou du thiophanate, ne va-t-elle pas relancer l'utilisation des benzimidazoles comme dicrocélicides et fasciolicides ?

L'oxfendazole par exemple peut être utilisé à triple dose comme dicrocélicide or il n'a pas encore une autorisation de mise sur le marché pour cette indication. Des études complémentaires sont attendues pour l'obtention d'une éventuelle extension d'autorisation de mise sur le marché.

Enfin de nouvelles spécialités pharmaceutiques à base de benzimidazole arrivent sur le marché français (Panacur Equine Guard^{N.D.} ou Flubenol easy^{N.D.}) en 2000 ou 2001.

Tout ceci nous incite plutôt à penser que les benzimidazoles ne sont pas une classe pharmaceutique déchuée mais bel et bien une famille d'antiparasitaires en puissance.

3- Législation et innocuité des médicaments :

L'innocuité comporte une notion de tout ou rien et c'est pourquoi il ne paraît pas opportun de l'employer en matière de médicament où tout n'est que question de degré. Les progrès accomplis depuis 20 ans ont mis à la disposition du thérapeute des produits de plus en plus actifs et par-là même de plus en plus dangereux ; et moins que jamais, aucun expert pharmacologue ou clinicien n'oserait affirmer qu'un médicament présente toute garantie d'innocuité.

Il est impossible à l'expert pharmacologue de garantir l'innocuité d'une substance médicamenteuse ; il ne peut qu'en apprécier la toxicité chez l'animal dans des conditions déterminées.

Quant au clinicien, une fois en possession de tous les résultats que lui fournit le pharmacologue, il peut seul définir les conditions normales d'emploi mais il lui est impossible autant qu'au pharmacologue, de conclure que le médicament est doué d'innocuité dans les conditions normales d'emploi.

La substitution « pas de danger pour la Santé Publique » au terme « innocuité » permet de répondre aux vœux des responsables de la protection de la population.

Par exemple, l'emploi de vaccins ne saurait être interdit malgré les accidents qu'ils entraînent parfois. En admettant le danger individuel implicitement et inévitablement lié à tout acte thérapeutique, cette définition garantit l'intérêt collectif de la population (G.E.R.T., 1961).

4- La morphométrie en tératologie :

Pour l'instant le quantitatif en tératologie se limite à l'étude des relations entre augmentation de la dose en mg/kg et augmentation de l'effet observé (en pourcentage de fœtus malformés, en nombre de femelles gravides, en nombre de malformations par fœtus...).

La morphométrie présente l'avantage d'introduire des notions quantitatives en tératologie plus larges que l'étude des augmentations des effets tératogènes en fonction de la dose.

La diminution de la taille d'un os ou d'un organe est un paramètre objectif qui peut tout à fait être révélé lors de l'utilisation de la morphométrie. Ce nouvel outil de recherche nous amène à creuser le sens d'embryotoxicité et tératogénèse.

L'embryotoxicité est une notion générale de toxicité du développement embryonnaire qui recouvre plusieurs faits : les malformations, les avortements, les naissances prématurées et les hypoplasies (la diminution de la taille des os en fait partie).

La tératogénèse fait plutôt appel aux seules malformations issues de dérèglements du développement au cours de la période embryonnaire. Il faut distinguer ces malformations des « anomalies » considérées comme de simples « variations » apparaissant dans un groupe témoin.

Pour l'instant, il est rare de lire que la toxicité observée d'un xénobiotique sur la gestation est une hypoplasie d'un os. En ce sens, la morphométrie va ajouter une dimension à l'étude de l'embryotoxicité d'un xénobiotique sur le squelette ; la diminution de taille des os va pouvoir être prise en compte. Cependant, tous les os ne sont pas mesurables et utilisables. Et l'embryotoxicité ne se manifeste pas seulement et nécessairement par des hypoplasies. Ainsi, l'ajout de la morphométrie dans l'étude du pouvoir tératogène d'un xénobiotique ne peut se substituer à toutes les autres techniques actuelles (qualitatives certes mais irremplaçables).

D'autre part en ce qui concerne les benzimidazoles, même s'il semble que les anomalies des membres soient une des caractéristiques de l'action du parabendazole chez le rat (Lapras *et al.*, 1973a) il n'est pas du tout évident que tous les benzimidazoles soient des embryotoxiques osseux dans toutes les espèces ; et que dire d'une substance dont on ne connaît pas a priori le mode d'action toxique... Un xénobiotique peut entraîner des malformations autres qu'osseuses ; dans ce cas la morphométrie n'apporte que peu de choses à la tératologie.

Il faut donc relativiser l'intérêt de la morphométrie en tératologie.

B- Discussion sur l'embryotoxicité en général :

1- Le risque tératogène : un risque en pleine expansion ?

Avec la modernisation de l'élevage et les conditions économiques actuelles, on assiste à de grands changements en agriculture. Pour des questions de rentabilité, la main d'œuvre est diminuée et l'on compte beaucoup plus d'animaux par agriculteur qu'auparavant. Pour des questions de rentabilité, des plans sanitaires d'élevage sont mis en place comportant des traitements systématiques afin d'éviter des pathologies. Pour des questions de rentabilité toujours, des groupages de chaleurs sont réalisés avec pour but des naissances groupées et une surveillance plus facile pour un personnel de moins en moins nombreux. Donc, sur les animaux de rente, de plus en plus de traitements systématiques sont réalisés sur un grand nombre d'animaux au même stade physiologique. Ainsi, pour les traitements ayant lieu en début de gestation, le risque tératogène devient beaucoup plus important.

De même chez la femme, la prise de médicaments y compris pendant la grossesse est de plus en plus massive dans les pays développés ; avec un suivi plus ou moins bien réalisé donc le risque tératogène s'en trouve augmenté.

En effet, « la France est un pays où la surconsommation médicamenteuse est flagrante et injustifiée » (Discours de Bernard Kouchner, Secrétaire d'Etat à la Santé, Conférence Nationale de la Santé, Lundi 22 juin 1998). Pour exemple, en France, la consommation de médicaments hors hôpital est passée de 211 francs par habitant et par an en 1970 à 2560 francs par habitant et par an en 1999 (Source : Syndicat National de l'Industrie Pharmaceutique, renseignements fournis par téléphone).

En médecine vétérinaire, en l'absence de recherche sur la toxicité des médicaments, le risque tératogène serait plus important du fait d'une consommation accrue des médicaments avec des habitudes de consommation qui ont évolué vers des situations plus à risque (groupement des mises-bas chez les animaux, grand nombre d'animaux traités).

Cette constatation de l'augmentation du risque tératogène aussi bien pour les animaux que pour l'homme donne tout son poids à la législation du médicament quant à la recherche d'une éventuelle embryotoxicité avant mise sur le marché.

2- Exemple de gestion du risque tératogène selon différentes firmes pharmaceutiques.

Cependant, même si la législation sur la recherche du pouvoir embryotoxique d'une molécule est établie et stricte aussi bien en France que dans la Communauté Economique Européenne, les politiques de gestion du risque tératogène sont différentes selon les firmes pharmaceutiques.

Dans certains cas, les risques embryotoxiques des médicaments mis sur le marché sont clairement indiqués en cas d'utilisation pendant la gestation.

Par exemple, pour la firme Intervet, la notice du Panacur Equine Guard ^{N.D.} précise : « les études menées chez les animaux de laboratoire (rat, lapin) n'ont pas mis en évidence d'effet embryotoxique ou tératogène aux doses thérapeutiques. L'innocuité chez la jument pendant la gestation et l'allaitement a été étudiée. L'utilisation de la spécialité chez la femelle pendant la gestation et l'allaitement ne pose pas de problème particulier. »

Dans d'autres cas, les médicaments sont clairement contre-indiqués pendant la gestation. Par exemple, pour la firme Schering Plough, la notice de Hapadex^{N.D.} précise « à la posologie large spectre (20 mg/kg), ne pas utiliser au cours du premier tiers de la gestation ».

Dans les cas les plus suspects, le vétérinaire ne sait s'il doit ou non utiliser la spécialité pendant la gestation. Il faut souligner que ces cas sont détestables et signent bien la relation uniquement commerciale qui peut exister entre un praticien et une firme pharmaceutique.

Par exemple, pour la firme Merial, la notice de Tenivalan^{N.D.} précise : « Utilisation en cas de gravidité et de lactation : les études menées chez les animaux de laboratoire (rat, lapin) n'ont pas mis en évidence d'effet tératogène, embryotoxique ou maternotoxique du praziquantel aux doses utilisées en thérapeutique. L'innocuité de la spécialité chez la jument pendant la gestation et l'allaitement n'a pas été étudiée. L'utilisation de la spécialité chez la jument pendant la gestation et l'allaitement devra faire l'objet d'une évaluation du rapport bénéfice risque par le vétérinaire » ; autrement dit le laboratoire décline toute responsabilité en cas d'utilisation chez la jument gravide... Certes, il existe une pharmacovigilance française et européenne, un comité européen du médicament existe déjà et gère les extensions ou les modifications d'A.M.M. en fonction des effets indésirables relevés sur le terrain. Cela dit, il est quand même périlleux de devoir évaluer soi-même au pied de l'animal le risque tératogène encouru avec des spécialités pharmaceutiques.

Heureusement, ces cas litigieux sont rares. La plupart des firmes pharmaceutiques (surtout en ce qui concerne les spécialités destinées aux animaux de rente et particulièrement aux bovins) ont bien compris que la rentabilité en élevage est obligatoire donc une femelle est bien plus souvent gravide que non gravide. Pour gagner des parts de marché, les firmes pharmaceutiques sont donc indirectement obligées de vendre des médicaments sûrs du point de vue toxicité du développement étant donné que les femelles sont très souvent gravides.

3- Législation, modèle expérimental et tératologie :

▪ Signification statistique :

Dans l'arrêté ministériel du 5 septembre 1994, il est précisé que « les modalités de l'expérience seront déterminées en tenant compte de la signification statistique que les résultats doivent atteindre ». Or il est très difficile de déterminer ou d'affirmer, a priori, à partir de quelle diminution de la taille des os, on peut dire que le produit est embryotoxique. Dans notre étude expérimentale, nous avons considéré que toute variation entre les deux moyennes des échantillons testés plus grande que la plus grande variation individuelle dans l'un des échantillons est le signe d'une embryotoxicité du xénobiotique.

D'autre part quel risque de première et de seconde espèce considérer ? 5% ? 1% ? Rien n'est réglementairement prévu en ce qui concerne ces valeurs statistiques. Il s'agit de justifier son propre « degré de signification statistique ». En ce qui concerne un médicament, on considère aussi le rapport bénéfice risque en fonction de l'état de gravité pathologique.

▪ Doses toxique et thérapeutique :

Dans l'arrêté ministériel du 5 septembre 1994, l'étude des effets sur la reproduction d'un médicament à mettre sur le marché est précisée : il convient d'utiliser au moins trois doses différentes. La dose la plus élevée doit normalement être choisie de façon à faire apparaître des effets nocifs. Les doses les plus faibles ne doivent produire aucun signe de toxicité. Dans cet arrêté ministériel, une comparaison éventuelle des doses toxique et atoxique avec la dose thérapeutique n'est jamais envisagée. Or, dès 1967, Bertrand et Delatour soulignent qu'il est plus intéressant de connaître le risque tératogène dans la zone d'utilisation thérapeutique d'un médicament qu'à des doses 50 ou 100 fois supérieures à la dose thérapeutique (Bertrand *et*

al., 1967). De plus, si des anomalies apparaissent à forte dose, il est possible qu'à faible dose, elles n'apparaissent pas (cf. le cas de l'albendazole) mais inversement certaines anomalies peuvent ne pas apparaître à de très fortes doses et peuvent apparaître uniquement à de faibles doses. En effet, de fortes doses peuvent tuer l'embryon et de très faibles doses permettront l'expression du pouvoir tératogène du xénobiotique. Il est donc très difficile à priori de trouver la bonne dose à tester lorsque l'on ne connaît pas le pouvoir tératogène d'un xénobiotique et que l'on veut l'étudier.

Il est également difficile dans le protocole expérimental de fixer la voie d'administration, la période d'administration et la durée d'administration d'un xénobiotique lorsque l'on veut étudier son embryotoxicité.

▪ **Comment une étude de screening sur l'embryon de poulet pourrait s'intégrer dans la législation ?**

Pour certains, la mise en route de nombreux essais visant à mettre en évidence le risque tératogène va augmenter le coût du médicament. En médecine humaine ce genre d'arguments n'est pas recevable tant que l'on se place dans le droite ligne de l'application du principe de précaution.

En médecine vétérinaire, certaines filières sont effectivement à la limite de l'équilibre économique et l'augmentation des charges sur certains ateliers économiques ne semble pas possible. Cela dit, la sécurité du médicament d'un point de vue embryotoxicité en garantissant une gestation, garantit souvent la rentabilité d'un élevage. D'autre part, les études de screening sur l'embryon de poulet ne sont pas d'un poids économique insoutenable et ne devraient pas amener un surcoût considérable.

Ainsi, d'un point de vue législatif, si l'embryon de poulet s'avérait être un modèle satisfaisant pour évaluer l'embryotoxicité au niveau squelettique, des études de screening pourraient être rendues obligatoires afin de garantir au consommateur le maximum de sécurités ; ceci, sans augmenter de façon inconsidérée le coût des études de mise sur le marché.

4- Difficultés de mise en évidence du risque tératogène :

▪ **Réunir toutes les conditions, mythe ou réalisable ?**

Pour mettre en évidence une éventuelle embryotoxicité voire le pouvoir tératogène d'un xénobiotique, il faut que différentes conditions soient réunies : la molécule active (qui a une structure chimique adéquate) doit être absorbée puis distribuée dans la sphère génitale femelle à la bonne dose et au bon moment. En effet, une relation entre la structure chimique et l'embryotoxicité a été démontrée par Delatour *et al.*, 1976 ; une relation entre absorption intestinale et embryotoxicité a été démontrée par Delatour *et al.*, 1984 ; une relation entre la dose et l'embryotoxicité est souvent soulevée, en particulier par Chassagne *et al.*, 1962 ; enfin une relation entre la période de traitement et l'embryotoxicité, aussi baptisée calendrier tératologique est rappelée par Langman, 1968.

Or est-on capable de réunir toutes ces conditions pour découvrir un pouvoir tératogène ?

D'autre part, lors de l'étude du pouvoir tératogène d'un médicament, il faut tester à la fois la molécule parentale mais aussi les métabolites de ce composé parental. Delatour *et al.*, 1981a, soulignent que les biotransformations que peut subir un médicament sont multiples et complexes. Or leur rôle ne peut être évalué à priori car si certaines voies permettent l'obtention de métabolites n'ayant plus la toxicité du composé parental, d'autres voies métaboliques engendrent in vivo des molécules plus actives que leur précurseur (Delatour *et al.*, 1981a). Il n'y a pas nécessairement une relation entre la toxicité d'un médicament et la toxicité de ses métabolites (Delatour, 1983).

Il semble donc difficile de réunir toutes les conditions pour détecter le pouvoir tératogène d'un xénobiotique et de ses métabolites. Cependant, ne pas pouvoir prouver l'effet tératogène d'un produit ne revient pas à prouver son innocuité (GERT, 1967)...

▪ **Le choix de l'espèce en toxicité du développement :**

L. Mercier-Parot, 1976 a démontré qu'il existe des sensibilités différentes au pouvoir tératogène du parabendazole dans des lignées de souris.

Comment savoir à l'avance quelle lignée va être sensible à l'activité tératogène d'une molécule dont on teste le pouvoir tératogène sans savoir s'il existe vraiment ?

Le choix de l'espèce est important quand on recherche un risque tératogène mais également le choix de la lignée. Tuchmann-Duplessis *et al.*, en 1965 soulignaient déjà qu'il y existe des lignées où le taux d'anomalies spontanées est plus élevé. Est-ce que ces lignées présentant plus d'anomalies spontanées sont plus adéquates pour démontrer le pouvoir tératogène d'un xénobiotique ou est-ce qu'au contraire il ne faut pas les employer pour éviter des conclusions par excès ?

5- Difficultés d'interprétation en tératologie :

Au cours de l'étude expérimentale de substances médicamenteuses, des difficultés d'interprétation peuvent survenir (Tuchmann-Duplessis *et al.*, 1965) : les unes sont dues aux réactions différentes d'une espèce animale à l'égard d'une substance chimique ; les autres proviennent de l'existence de malformations spontanées comme chez la souris et le lapin.

Dans le cas du thalidomide ou du parabendazole, la molécule ne présente pas un pouvoir tératogène stable selon les espèces. Dans ce cas, que conclure quant à l'extrapolation des résultats de laboratoire aux autres espèces et en particulier à l'Homme ?

En tératologie, un double problème se pose donc : d'une part il faut déceler les activités tératogènes avant qu'un accident clinique n'ait été signalé et d'autre part il faut dire dans quelle mesure un doute exprimé à l'égard d'un médicament est fondé.

Aussi, certaines anomalies semblent bénignes (torsion de la queue, ouverture prématurée des yeux) or doit-on les classer de la même manière que des anomalies plus frappantes (cyclopie ; phocomélie...) ?

Enfin, un problème quantitatif se pose également : d'après les statistiques (test de chi deux de Pearson), si on n'a aucune anomalie sur 200 témoins, le seuil de signification est atteint à partir de 9 anomalies sur 500 fœtus traités... or si on a 10 torsions de la queue ou 8 cyclopies, que doit-on en conclure ?

Le problème de la conclusion fait toujours appel à une part d'arbitraire même en science. Chassagne *et al.*, 1962, affirment que devant le problème soulevé par la prévision de l'effet tératogène des médicaments, le pharmacologue se sent à la fois écrasé de responsabilités et très embarrassé pour fournir au clinicien des garanties sérieuses.

C- Discussion de l'étude expérimentale :

1- Matériel et méthodes :

▪ Le matériel biologique (œufs, solvant et sulfoxyde d'albendazole) :

En fonction de la période de ponte, le poids des œufs n'est pas le même, il faut donc en tenir compte pour l'évaluation de la concentration du xénobiotique et le volume à injecter dans l'œuf. Les embryons témoins et les embryons traités doivent être issus d'œufs pondus à la même période et doivent être incubés dans les mêmes conditions. L'idéal serait l'utilisation du même incubateur au même moment pour éviter au maximum les artefacts.

Dans notre expérimentation les œufs ne sont jamais stockés plus d'un ou deux jours à température ambiante, cela dit le lieu de ponte et le laboratoire sont distants d'environ 300 km ; or Ancel préconise de limiter les facteurs physiques pour éviter l'apparition de malformations spontanées chez l'embryon de poulet. Dans une expérimentation future, il serait donc opportun de rapprocher le laboratoire et le lieu de ponte.

D'après les travaux de Blackwood souvent cités par Manesse (Manesse, 1993) l'embryon de poulet est sensible au pouvoir tératogène des benzimidazoles. Or est-ce que les os de l'embryon de poulet sont vraiment sensibles au pouvoir embryotoxique des benzimidazoles et à quelle dose ?

▪ Méthodes : De l'œuf à l'embryon

Dans notre expérimentation, la durée d'incubation est de 15,5 jours, ce qui est différent de l'étude de L. Pagèze qui mesurait les os à 19 jours d'incubation (Pagèze, 1995 ; Pagèze *et al.*, 1996).

Or nous avons supposé que les os et les paramètres morphométriques étaient utilisables dans un test tératologique mais à 19 jours d'incubation. Les os présentent en effet une certaine stabilité avec une variation individuelle limitée à 19 jours d'incubation ce qui n'est pas obligatoirement le cas à 15,5 jours d'incubation.

D'un autre côté, plus on allège le temps de l'incubation et plus on allège le poids et le coût de la manipulation. Les risques d'erreurs liés à une défaillance des conditions d'incubation sont également réduits. (panne de l'incubateur, dérèglement de la température, problème de déshydratation).

De plus les derniers jours d'incubation correspondent à un pic de mortalité embryonnaire à l'état naturel (Sauveur B, 1988)

Les embryons plus jeunes que 19 jours d'incubation sont également plus faciles à disséquer, à manipuler et à diaphaniser. En plus, d'après Laurent Pagèze dans sa thèse de 1995, jusqu'au 14^{ème} jour d'incubation, il n'y a pas de corrélation entre le poids de l'œuf et le poids de l'embryon. Il y a une plus faible corrélation à 15,5 jours d'incubation qu'à 19 jours. Or il se trouve que nous cherchons à minimiser l'influence du poids de l'œuf sur le développement embryonnaire.

Quoi qu'il en soit, nous avons retenu une période d'incubation de 15,5 jours en consensus avec la Faculté Vétérinaire de Barcelone mais des stades inférieurs comme le 12^{ème} jour seraient intéressants à envisager ultérieurement ; en utilisant par exemple aussi une méthode de double coloration à la fois des tissus osseux et cartilagineux.

▪ Méthodes : Les différents traitements

Nous avons réalisé des traitements à la 54^{ème} heure d'incubation avec des concentrations donc des doses de sulfoxyde d'albendazole différentes... Hors nous ne savons toujours pas quelle dose de sulfoxyde d'albendazole utiliser pour avoir une concentration de 1,6 µg/ml dans l'embryon à la 54^{ème} d'incubation...peut-être que dans notre protocole seul le traitement à 0.001 mg/ml permet une solubilisation et un passage dans l'embryon rapide... Aucune étude pharmacologique sur les injections de sulfoxyde d'albendazole sous le disque embryonnaire dans l'œuf de poule n'est disponible à notre connaissance.

Dans nos traitements, le sulfoxyde d'albendazole est effectivement injecté sous le disque embryonnaire, pour éviter le phénomène de diffusion différentielle lors de l'injection dans l'albumen, mise en évidence la première fois par Manesse (Manesse, 1993) puis par Navarro *et al.*, 1997.

Pour prévoir au maximum la dose de sulfoxyde d'albendazole à apporter au contact de l'embryon nous avons injecté le plus près possible de cet embryon. Cela dit une étude pharmacologique de la diffusion de l'albendazole dans l'embryon de poulet serait la bienvenue pour éclairer nos essais cliniques et vérifier que la dose de 1,6 µg/ml est bien atteinte.

Dans notre étude l'injection devrait peut-être avoir lieu plus tôt que la 54^{ème} heure d'incubation pour tenir compte de la diffusion du sulfoxyde dans l'embryon de poulet.

▪ Méthodes : La coloration

Si l'embryon est trop jeune il risque d'être complètement détruit par la soude. Il faut donc être très attentif lors de cette étape près coloration.

Sinon, la coloration ne pose que très peu de problème puisque la technique est bien codifiée. De la coloration dépend la qualité de l'extraction automatique réalisée par le logiciel de morphométrie. Ainsi une double coloration (à la fois des tissus osseux et cartilagineux mais d'une couleur différente pour chacun d'eux) améliorerait sans doute notre technique.

▪ Méthodes : Les mesures

L'extraction automatique n'est pas toujours parfaite avec le logiciel de mesure dont nous disposons cela dit ce logiciel a énormément évolué entre le moment de nos mesures et aujourd'hui. On peut par exemple combiner extraction automatique et manuelle pour améliorer l'estimation des mesures.

2- Résultats :

Il est très facile de tester la validité de la technique avec des modèles statistiques, il est plus difficile de traiter toutes les données. En fait, certaines mesures ont été volontairement écartées pour éviter d'introduire des erreurs or n'est-ce pas dans ces mesures que l'on avait la réponse ou la preuve que le sulfoxyde d'albendazole est ou n'est pas embryotoxique chez l'embryon de poulet ?

En effet après l'injection de sulfoxyde d'albendazole des morts sont apparues et n'ont pas été enregistrées dans notre étude. Or il faudrait enregistrer ces données et interpréter les mesures morphométriques en tenant compte de ces mortalités qui ont lieu avant la fin de la période d'incubation souhaitée.

Les embryons retrouvés morts avant les 15,5 jours d'incubation auraient-ils été plus petits ou plus grand que les embryons témoins ?

Que faire donc des données qui ne rentrent pas dans le protocole expérimental. ?

D'autre part doit-on mesurer les membres droit et gauche ou seulement un seul côté et lequel. Si l'on prend en compte les deux latérales, doit-on considérer ces mesures indépendantes d'un point de vue statistique, faut-il les lier ou les considérer comme indépendantes ?

▪ **Expérience n° 1 :**

Dans l'expérience n°1, nos résultats sont très encourageants même si la preuve statistique n'est pas au bout du travail. Nous travaillons sur des échantillons beaucoup trop faibles pour pouvoir prouver des différences significatives ou pour conclure définitivement sur le sujet ; cependant les graphiques nous poussent à envisager de poursuivre ces études avec des lots plus importants.

Dans notre étude statistique, lorsque l'effet du traitement ne peut pas être mis en évidence, nous concluons toujours avec un risque de seconde espèce β très grand puisque β est lié à la taille des échantillons par la formule :

$$U_{1-\beta} = \sqrt{n/2} - 1.96$$

Avec n = effectif le plus petit des deux échantillons et $U \sim N(0,1)$

Pour conclure définitivement que le sulfoxyde d'albendazole n'a pas d'effet sur la taille des os de l'embryon de poulet (si tel est le cas), il faudrait trouver aucune différence significative entre des embryons témoins et des embryons traités avec un risque de seconde espèce acceptable (de 5% ou 1% voire 2‰). Or d'après la formule précédente, si β est égal à 5%, la taille minimale de l'échantillon sera de 26 embryons par groupe ; si β est égal à 1%, la taille minimale de l'échantillon sera de 37 embryons par groupe et si β est égal à 2‰, la taille minimale de l'échantillon sera de 47 embryons par groupe.

Il ne semble pas que ce soit irréalisable d'un point de vue pratique dans la perspectives de nouvelles expérimentations.

▪ **Expérience n° 2 et n° 3 :**

L'expérience n°2 qui étudie 10 et 100 fois la concentration supposée toxique, n'amène que peu de résultats même graphiques. On peut se demander si c'était un hasard dans l'expérience n°1 si les traités étaient systématiquement plus petits que les témoins. Cela dit dans l'expérience n°2, les doses ont pu amener de la mortalité et donc un manque de mesures à 15,5 jours d'incubation. Il est donc possible que les mesures de l'expérience n°2 ne reflètent pas du tout la toxicité du sulfoxyde d'albendazole sur l'embryon de poulet. Renouveler ces expériences avec des lots plus importants et un enregistrement détaillé de la mortalité embryonnaire avant la fin de l'incubation seraient souhaitables. Les mêmes conclusions sont valables pour l'expérience n°3.

IV- CONCLUSIONS GENERALES :

Les benzimidazoles sont des médicaments vétérinaires appartenant à la classe thérapeutique des antiparasitaires. Ils sont tous doués d'embryotoxicité à des doses supra-thérapeutiques (albendazole, oxfendazole) voire pour certains à des doses thérapeutiques (nétopimmin).

L'embryotoxicité d'un médicament vétérinaire, quelle que soit son indication, est réglementairement et obligatoirement étudiée avant mise sur le marché.

L'étude de l'embryotoxicité fait appel à des modèles expérimentaux, souvent il s'agit d'une étude qualitative du développement embryonnaire de mammifères de laboratoire (rat, souris, lapin) sous l'influence d'un xénobiotique.

Dans notre synthèse bibliographique, la possibilité d'utiliser l'embryon de poulet comme modèle d'évaluation du risque tératogène est envisagée.

La possibilité d'introduire une étude quantitative sur le squelette de l'embryon de poulet grâce à la morphométrie est également considérée.

Notre étude expérimentale consiste en la mesure des os du squelette appendiculaire de l'embryon de poulet soumis à divers traitements. On mesure en effet trois paramètres morphométriques (grand diamètre de Férêt, périmètre et surface) des fémur, tibiotarse, tarsométatarse, humérus, radius, ulna et métacarpe de l'embryon de poulet. Au cours de cette étude, différents échantillons d'embryons sont mesurés : des embryons témoins, des embryons auxquels nous avons fait un trou dans la coquille, des embryons auxquels nous avons injecté du solvant, et enfin des embryons auxquels nous avons injecté du sulfoxyde d'albendazole à différentes concentrations.

A la lumière de notre analyse de la variance devant l'ensemble de nos mesures, nous ne pouvons pas conclure de façon définitive sur l'effet du sulfoxyde d'albendazole sur l'organogenèse du squelette appendiculaire de l'embryon de poulet. Les représentations graphiques de nos résultats, certes encourageantes, ne se traduisent pas par une réponse statistiquement significative. D'autres démarches expérimentales seront nécessaires pour arriver à ces conclusions. Notre étude contribue donc surtout à préciser les conditions d'expérience ultérieures.

En conclusion nous finirons par une pensée du philosophe Gaston Bachelard : « c'est en termes d'obstacles qu'il faut poser le problème de la connaissance scientifique ». La connaissance de l'embryon de poulet en tant que modèle d'évaluation du risque tératogène est semée d'obstacles que nous franchissons plus ou moins rapidement depuis les travaux de Manesse en passant par ceux de Cristofol, Navarro, Pagèze ou les nôtres. La démonstration de l'effet embryotoxique du sulfoxyde d'albendazole sur l'organogenèse du squelette appendiculaire de l'embryon de poulet reste à faire. Il faudrait des examens complémentaires de manière à infirmer ou confirmer le bien fondé de telles recherches sur ce modèle d'évaluation de l'embryotoxicité. Nous restons bien sûr optimistes mais prudents dans la promotion de ce modèle expérimental en tératologie.

Références bibliographiques :

ACTOR, P., ANDERSON, E.L., DICUIOLLO, C.J., FERLAUTO, R.J., HOOVER, J.R., PAGANO, J.F., RAVIN, L.R., SCHEIDY, S.F., STEDMAN, R.J., THEODORIDES, V.J.
New broad spectrum anthelmintic, methyl-5(6)-butyl-2-benzimidazole carbamate.
Nature, 1967 juillet, **215**, 98, 321-322.

ALVAREZ, L.I., SANCHEZ, S.F., LANUSSE, C.E. a.
Modified plasma and abomasal disposition of albendazole in nematode-infected sheep.
Veterinary Parasitology, 1997, **69**, 241-253.

ALVAREZ, L.I., SANCHEZ, S.F., LANUSSE, C.E. b.
Plasma and abomasal availability of albendazole administered by different routes to sheep.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997, **20**, suppl.1, 70-71.

ANCEL, P.
La chimiotérogénèse chez les vertébrés. Paris : Doin Editeurs, 1950. 397.

ANGELINI, C., COSTA, M., MORESCALCHI, F., CIMOLI, G., CONIGLIO, L., FALUGI, C.
Muscarinic drugs affect cholinesterase activity and development of eye structures during early chick development.
European Journal of Histochemistry, 1998, **42**, 4, 309-320.

ARBOIX, M., LAPORTE, J.R., FRATI, M.E., RUTLLAN, M.
Effect of age and sex on acenocumarol requirements.
British Journal of Clinical Pharmacology, 1994, **18**, 475-479.

AVERKIN, E.A., BEARD, C.C., DVORAK, C.A., EDWARDS, J.A., FRIED, J.H., KILIAN, J.G., KISTNER, T.P., DRUDGE, J.H., LYONS, E.T., SHARP, M.L., CORWIN, R.M., SCHILTZ, R.A.
Methyl-5(6)-phenyl sulfinyl-2-benzimidazole carbamate : a new potent anthelmintic.
Journal of Medical Chemistry, 1975 novembre, **18**, 11, 1164-1166.

BAEDER, C., BAHR, H., CHRIST, O., DUWELL, D., KELLNER, H.M., KIRSCH, R., LOEWE, H., SCHULTES, E., SCHUTZ, E., WESTEN, H.
Fenbendazole : a new, highly effective anthelmintic.
Experientia, 1974 juillet, **30**, 7, 753-754.

BAUER, C., HAFNER, M.
Efficacy of two formulations of netobimin against gastrointestinal helminths in sheep.
The Veterinary Record, 1990 décembre, **127**, 621-622.

BENCHAOUI, H.A., SCOTT, E.W., MCKELLAR, Q.A.
Pharmacokinetics of albendazole, albendazole sulfoxide and netobimin in goats.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1993, **16**, 237-240.

BERNDTSON, W.E., CHENOWETH, P.J., OSLAR, T.T., PICKETT, B.W., SEIDEL, G.E.
Influence of albendazole on reproductive function of bulls.
American Journal of Veterinary Research, 1980, **41**, 640-644.

- BERTRAND, M., DELATOUR, P.
Conditions expérimentales de la recherche du risque tératogène.
Revue de Pathologie Comparée, 1967, **789**, 337-357.
- BERTRAND, M., FLORIO, R., DAMS, R., DELATOUR, P.
Notes de chimiotératogénèse.
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon, 1963, **65**, 4, 227-239.
- BLACKWOOD, U.B.
The changing inhibition of early differentiation and general development in the chick embryo by 2-ethyl-5-methylbenzimidazole and chloramphenicol.
Journal of Embryology and Experimental Morphology, 1962, **10**, 315-336.
- BORAY, J.C., CROWFOOT, P.D., STRONG, M.B., ALLISON, J.R., SCHELLENBAUM, M.VON, ORELLI, M., SARASIN, G.
Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole.
The Veterinary Record, 1983, **112**, 315-317.
- BORGSTEEDE, F.H.M., STALLINGA, A.P.T.
The efficacy of netobimin against a benzimidazole susceptible and a resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep in the Netherlands.
The Veterinary Quarterly, 1990 octobre, **12**, 4, 241-246.
- BROWN, H.D., MATZAK, A.R., ILVES, I.R. *et al.*
Antiparasitic drugs IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole : a new anthelmintic.
Journal of American Chemical Society, 1961, **83**, 1764-1765.
- BRUGMAN, J.P., THIENPONT, D.C., VAN WIJNGAARDEN, I., VAN PARYS, O.F., SCHUERMANS, V.L., LAUWERS, H.L.
Mebendazole in enterobiasis. Radiochemical and pilot clinical study in 1,278 subjects.
Journal of American Medical Association, 1971, **217**, 313-316.
- CABARET, J.
Efficacy of netobimin against *Muellerius capillaris* and resistant strain of digestive tract strongyles in dairy goats.
American Journal of Veterinary Research, 1991 août, **52**, 8, 1313-1315.
- CAMPBELL, N.J., HALL, C.A.
The anthelmintic efficacy of albendazole against *Fasciola hepatica* and benzimidazole resistant strains of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep.
Research in Veterinary Science, 1979, **26**, 90-93.
- CAPECE, B.P., CASTELLS, G., PEREZ, F., ARBOIX, M., CRISTOFOL, C.
Pharmacokinetic behaviour of albendazole sulphoxide enantiomers in male and female sheep.
Veterinary Research Communications, 2000 juillet, **24**, 5, 339-348.
- CHARTIER, C., PORS, I., BERNARD, N., HUBERT, J.
Efficacy of an albendazole slow-release capsule for the control of susceptible or resistant nematode parasites of dairy goats.
Veterinary Parasitology, 1996 décembre, **67**, 3-4, 197-206.

CHASSAGNE, P., LECHAT, P.

A propos de l'effet tératogène des médicaments.

Thérapie, 1962, **17**, 743-755.

CORBA, J., SPALDONOVA, R., HOVORKA, J., ANDRASKO, H.

Efficacy of luxabendazole /Hoe 216 v/ against the most important helminthoses of sheep.

In :VTH International Helminthological Symposium, Helminths, Helminthoses, Environment, strbske plaso, Czechoslovakia.

CRISTOFOL, C., NAVARRO, M., FRANQUELO, C., VALLADARES, J.E., ARBOIX, M.

Sex differences in the disposition of albendazole metabolites in sheep.

Veterinary Parasitology, 1998, **78**, 223-231.

CRISTOFOL, C., FRANQUELO, C., ARBOIX, M. a.

Disposition of NTB metabolites in male and female sheep : differences between sex.

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997, **20**, suppl.1, 72-73.

CRISTOFOL, C., FRANQUELO, C., NAVARRO, M., CARRETERO, A., RUBERTE, J., ARBOIX, M. b.

Comparative pharmacokinetics of netobimin metabolites in pregnant ewes.

Research in Veterinary Science, 1997 mars-avril, **62**, 2, 117-120.

CRISTOFOL, C., NAVARRO, M., FRANQUELO, C., VALLADARES, J.E., CARRETERO, A., RUBERTE, J., ARBOIX, M. c.

Disposition of netobimin, albendazole, and its metabolites in the pregnant rat : developmental toxicity.

Toxicology and Applied Pharmacology, 1997, **144**, 56-61.

CRISTOFOL, C., CARRETERO, A., FERNANDEZ, M., NAVARRO, M., SAUTET, J., RUBERTE, J., ARBOIX, M.

Transplacental transport of netobimin metabolites in ewes.

European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 1995, **20**, 3, 167-171.

CRISTOFOL, C., RUBERTE, J., CARRETERO, A., NAVARRO, M., FRANQUELO, C., SAUTET, J., ARBOIX, M.

Comparative pharmacokinetics of netobimin in pregnant and non-pregnant ewes.

In : 6th International Congress. European Association of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Edinburg (Scotland), 7-11 august 1994, p.266-267.

DELATOUR, P., BENOIT, E., LECHENET, J., BESSE, S.

Pharmacokinetics in sheep and cattle of albendazole administered by an intraruminal slow release capsule.

Research in Veterinary Science, 1990, **48**, 271-275.

DELATOUR, P., GYURIK, R.J., BENOIT, E., GARNIER, F.

Pharmacokinetics of albendazole administered by an intraruminal pulse release electronic device in cattle.

Research in Veterinary Science, 1987, **43**, 284-286.

DELATOUR, P., CURE, M.C., BENOIT, E., GARNIER, F.

Netobimin (Totabin-SCH): preliminary investigations on metabolism and pharmacology.

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1986, **9**, 230-234.

- DELATOUR, P., GARNIER, F., BENOIT, E., LONGIN, C.H.
A correlation of toxicity of albendazole and oxfendazole with their free metabolites and bound residues.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1984, **7**, 139-145.
- DELATOUR, P.
Some aspects of the teratogenicity of veterinary drugs.
Veterinary Research Communications, 1983, **7**, 125-131.
- DELATOUR, P., EUZEBY, J.
Communautés structurale, métabolique et anthelminthique entre febantel, fenbendazole et oxfendazole.
Le Point Vétérinaire, 1983 février, **15**, 71, 63-67.
- DELATOUR, P., YOSHIMURA, H., GARNIER, F., BENOIT, E.
Embryotoxicité comparée des métabolites de l'oxfendazole.
Recueil de Médecine Vétérinaire, 1982, **158**, 4, 369-373.
- DELATOUR, P., BURGAT-SACAZE, V. a.
Vers une procédure alternative d'évaluation toxicologique des résidus ? Application aux anthelminthiques dérivés du benzimidazole.
Recueil de Médecine Vétérinaire, 1981, **157**, 2, 213-218.
- DELATOUR, P., PARISH, R.C., GYURIK, R.J. b.
Albendazole : a comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites.
Annales de Recherches Vétérinaires, 1981, **12**, 2, 159-167.
- DELATOUR, P., DEBROYE, J., LORGUE, G., COURTOT, D.
Embryotoxicité expérimentale de l'oxfendazole chez le rat et le mouton.
Recueil de Médecine Vétérinaire, 1977, **153**, 10, 639-645.
- DELATOUR, P., RICHARD, Y.
Propriétés embryotoxiques et antimétaboliques en série benzimidazole.
Thérapie, 1976, **31**, 505-515.
- DELATOUR, P., LORGUE, G., COURTOT, D., LAPRAS, M. a.
Embryotoxicité expérimentale du cambendazole (MK 905) chez le mouton.
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon, 1975, **77**, 3, 197-203.
- DELATOUR, P., LORGUE, G., LAPRAS, M., RICHARD, Y., NAIN, CANTENOT, G. b.
Mise en évidence des propriétés antimétaboliques du cambendazole.
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon, 1975, **77**, 3, 185-194.
- DELATOUR, P., LORGUE, G., LAPRAS, M., DESCHANEL, J.-P.
Propriétés embryotoxiques (rat) et résidus (ovins, bovins) de trois anthelminthiques dérivés du benzimidazole.
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon, 1974, **76**, 2, 147-154.

- DIDIER, E.S., MADDY, J.A., KWONG, C.D., GREEN, L.C., SNOWDEN, K.F., SHADDUCK, J.A.
Screening of compounds for antimicrosporidial activity in vitro.
Folia Parasitologica, 1998, **45**, 2, 129-139.
- D.M.V.2001 : Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires. 11^{ème} édition.
Maisons-Alfort :Editions du Point Vétérinaire, 2001, 1814.
- DOWNEY, N.E.
Action of netobimin in drinking water on nematode parasites in calves.
The Veterinary Record, 1987 septembre, **121**, 275.
- DUNCAN, W.A.M., LEMON, P.G.
The effects of methyl-5(6)-butyl-2-benzimidazole carbamate (parbendazole) on reproduction in sheep and other animals.VIII. Teratogenicity in the rat.
The Cornell Veterinarian, 1974, **64**, suppl. 4, 97-103.
- DUVAL, M.
Atlas d'embryologie.- Paris, Masson éditeurs, 1889. 116.
- EDRINGTON, T.S., HARVEY, R.B., KUBENA, L.F.
Toxic effects of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A, alone and in combination on chicken embryos.
Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1995, **54**, 331-336.
- FABRE, J.M., BERTHELOT, X., FERNEY, J.
Embryotoxicité des antiparasitaires chez les ovins : observation clinique.
Revue de Médecine Vétérinaire, 1989, **140**, 12, 1089-1095.
- FARGETTON, X., GALTIER, P., DELATOUR, P.
Sulfoxidation of albendazole by a cytochrome P450-independent monooxygenase from rat liver microsomes.
Veterinary Research Communications, 1986, **10**, 317-324.
- FENTEM, J.H., FRY, J.R.
Comparison of effects of inducers of cytochrome P450 on Mongolian gerbil and rat hepatic microsomal monooxygenase activities.
Xenobiotica, 1991, **21**, 7, 895-904.
- FLORENTIN, F.
Transfert placentaire de l'albendazole et de ses métabolites sulfoxyde et sulfone chez le rat.
Thèse : Méd. Vét. : Lyon : 1986 ; n° 67 bis. 35.
- FOREYT, W.J.
Efficacy and safety of albendazole against experimentally induced *Fasciola hepatica* infections in goats.
Veterinary Parasitology, 1988 janvier, **26**, 3-4, 261-264.
- GALTIER, P., ALVINERIE, M.
Pharmacological basis for hepatic drug metabolism in sheep.
Veterinary Research, 1996, **27**, 363-372.

- GARCIA-LLAMAZARES, J.L., ALVAREZ-DE-FELIPE, A.I., REDONDO-CARDENA, P.A., PRIETO-FERNANDEZ, J.G.
Echinococcus granulosus : membrane permeability of secondary hydatid cysts to albendazole sulphoxide.
Parasitology Research, 1998 mai, **84**, 5, 417-420.
- GARCIA-LLAMAZARES, J.L., ALVAREZ-DE-FELIPE, A.I., REDONDO-CARDENA, P., VOCES-ALONSO, J.A., PRIETO-FERNANDEZ, J.G.
 In vivo inhibition of the regenerative capacity of hydatid material after treatment with netobimin.
Parasitology Research, 1997, **83**, 2, 105-108.
- GAYTAN, F., RANZ, F.B., ACEITERO, J.
 Morphometric study of cartilage dynamics in the chick embryo tibia.I. Methodology and tissue compartments in normal embryos.
Journal of Anatomy, 1987 octobre, **154**, 63-71.
- GHOSH, C., BANDYPADHYAY, S., MEDDA, J.N.
 Protective role of thyroxine in methylparathion intoxicated chick embryos.
Drug and Chemical Toxicology, 1998 novembre, **21**, 4, 495-506.
- GILES, J.J., BANNIGAN, J.G.
 The effects of lithium on vascular development in the chick area vasculosa.
Journal of Anatomy, 1999 février, **194**, 2, 197-205.
- GROUPE D'ETUDE DES RISQUES TERATOGENES (G.E.R.T.).
 Tératogénèse expérimentale : étude de la caféine chez la souris.
Thérapie, 1969, **24**, 575-580.
- GROUPE D'ETUDE DES RISQUES TERATOGENES (G.E.R.T.).
 Sur les difficultés d'interprétation de l'étude des risques tératogènes : les conditions expérimentales et les malformations spontanées chez la souris.
Thérapie, 1967, **22**, 469.
- GROUPE D'ETUDE DES RISQUES TERATOGENES (G.E.R.T.).
 A propos de l'innocuité des médicaments.
Thérapie, 1961, **15**, 502-506.
- HALLU, R., FERRERO, O., ALBARELLOS, G., BUSSO, E., REBUELTO, M.
 Effects of high doses of albendazole administered to dogs.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997 juillet, **20**, suppl.1, 264-265.
- HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L.
 A series of normal stages in the development of the chicken embryo.
Journal of Morphology, 1951, **88**, 49-92.
- HANCOCK, N.A., POULTER, D.A.L.
 The effects of the methyl-5(6)-butyl-2-benzimidazole carbamate (parbendazole) on reproduction in sheep and other animals.VII. Effect in the pregnant sow.
The Cornell Veterinarian, 1974, **64**, suppl.4, 92-96.

HEITZ, D.

Pharmacocinétique de l'albendazole chez le mouton à la dose orale unique de 15 mg/kg PV.
Thèse : Méd. Vét. : Lyon : 1988 ; n° 48. 67.

HERLICH, H.

Anthelmintic efficacy of albendazole in cattle : comparison of critical and controlled test.
American Journal of Veterinary Research, 1977 août, **38**, 8, 1247-1248.

HOFF, D.R., FISCHER, M.H., BOCHIS, R.J. LUSI, A., WAKSMUNSKI, F., EGERTON, J.R., YAKSTIS, J.J., CUCKLER, A.C., CAMPBELL, W.C.

A new broad spectrum anthelmintic : 2-(4-thiazolyl)-5-isopropoxycarbonylamino-benzimidazole.

Experientia, 1970 mai, **26**, 5, 550-551.

HORTON, R.J.

Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis : 12 years of experience.

Acta Tropica, 1997, **64**, 1-2, 79-93.

JACOBS, D.E., PILKINGTON, J.G., FOX, M.T.

Netobimin in drinking water for treatment of bovine parasitic bronchitis : a field experiment.

The Veterinary Record, 1988 octobre, **123**, 16, 411-413.

JELINEK, R., MARHAN, O.

Validation of the Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST). A comparative study.

Functional and. Developmental Morphology, 1994, **4**, 4, 317-323.

JELINEK, R.

Use of chick embryo for screening in teratogenicity.

Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis, 1982, **2**, 2-3, 255-261.

JOHNS, D.J., PHILIP, J.R.

Albendazole safety in sheep.

In : Proceeding of the 8th International Conference, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Sydney, 1977, p.58.

JONES, L.H.P., LEAVER, D.D., MILNE, A.A.

Toxic effects in sheep following the administration of 2 phenyl benzimidazole as an anthelmintic.

Research Veterinary Science, 1965, **6**, 316-323.

JULIAN, D., ABBOTT, U.K.

An avian model for comparative studies of insulin teratogenicity.

Anatomia, Histologia, Embryologia, 1998 octobre, **27**, 5, 313-321.

JUSTE JORDAN, R.A., GARCIA PEREZ, A.L.

Effect of treatment with netobimin on milk production of sheep.

Veterinary Parasitology, 1991, **38**, 2-3, 173-183.

KELLY, J.D., HALL, C.A., WHITLOCK, H.V., THOMPSON, H.G., CAMPBELL, N.J., MARTIN, I.C.A.

The effect of route of administration on the anthelmintic efficacy of the benzimidazole anthelmintics in sheep infected with strains of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* resistant or susceptible to thiabendazole.

Research in Veterinary Science, 1977, **22**, 161-168.

KENNETH, S.T., MANFORD, E.M.

Evaluation of albendazole in cattle naturally infected with nematodes.

American Journal of Veterinary Research, 1982 mars, **43**, 3, 551-552.

KNIGHT, R.A., COLGLAZIER, M.L.

Albendazole as a fasciolicide in experimentally infected sheep.

American Journal of Veterinary Research, 1977 juin, **38**, 6, 807-808.

KOTWANI, A.

Use of chick embryo in screening for teratogenicity.

Indian Journal of Physiology and Pharmacology, 1998 avril, **42**, 2, 189-204.

LANGMAN, J.

Embryologie médicale. 1^{ère} édition.

Paris : MASSON et Cie Editeurs, 1968. 339.

LANUSSE, C.E., GASCON, L.H., PRICHARD, R.K. a.

Gastrointestinal distribution of albendazole metabolites following netobimin administration to cattle : relationship with plasma disposition kinetics.

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1993 mars, **16**, 1, 38-47.

LANUSSE, C.E., NARE, B., PRICHARD, R.K. b.

Comparative sulphoxidation of albendazole by sheep and cattle liver microsomes and the inhibitory effect of methimazole.

Xenobiotica, 1993 mars, **23**, 3, 285-295.

LANUSSE, C.E., GASCON, L., PRICHARD, R.K. a.

Methimazole-mediated modulation of netobimin biotransformation in sheep : a pharmacokinetic assessment.

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1992, **15**, 267-274.

LANUSSE, C.E., NARE, B., GASCON, L.H., PRICHARD, R.K. b.

Bioconversion of netobimin pro-drug by gastrointestinal fluids of ruminants.

European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 1992 avril-juin, **17**, 2, 121-128.

LANUSSE, C.E., NARE, B., GASCON, L.H., PRICHARD, R.K. c.

Metabolism of albendazole and albendazole sulphoxide by ruminal and intestinal fluids of sheep and cattle.

Xenobiotica, 1992, **22**, 4, 419-426.

LANUSSE, C.E., PRICHARD, R.K. d.

Methimazole increases the plasma concentrations of the albendazole metabolites of netobimin in sheep.

Biopharmaceutics and Drug Disposition, 1992 mars, **13**, 2, 95-103.

- LANUSSE, C.E., PRICHARD, R.K. e.
Effects of methimazole on the kinetics of netobimin metabolites in cattle.
Xenobiotica, 1992 janvier, **22**, 1, 115-123.
- LANUSSE, C.E., PRICHARD, R.K. a.
Enhancement of the plasma concentration of albendazole sulphoxide in sheep following coadministration of the parenteral netobimin and liver oxidase inhibitors.
Research in Veterinary Science, 1991 novembre, **51**, 3, 306-312.
- LANUSSE, C.E., TRUDEAU, C., RANJAN, S., PRICHARD, R.K. b.
Pharmacokinetic profiles of netobimin metabolites after oral administration of zwitterion and trisamine formulations of netobimin to cattle.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1991 mars, **14**, 1, 101-108.
- LANUSSE, C.E., PRICHARD, R.K. a.
Pharmacokinetic behaviour of netobimin and its metabolites in sheep.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1990, **13**, 170-178.
- LANUSSE, C.E., RANJAN, S., PRICHARD, R.K. b.
Comparison of pharmacokinetic variables for two injectable formulations of netobimin administered to calves.
American Journal of Veterinary Research, 1990 septembre, **51**, 9, 1459-1463.
- LAPRAS, M., DELATOUR, P., LABE, J., PANARIN, M.J., RICHARD, Y.
Etude expérimentale des propriétés anticancéreuses potentielles du parbendazole (SKF 29044).
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon, 1975, **77**, 6, 379-397.
- LAPRAS, M., DELATOUR, P., DESCHANEL, J.-P., LORGUE, G., CAMPS, S., REGNIER, B. a.
Etude expérimentale de l'activité tératogène du parbendazole (S.K.F. 29044) chez le rat.
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon, 1973, **75**, 2, 117-130.
- LAPRAS, M., DELATOUR, P., DESCHANEL, J.-P., LORGUE, G., CAMPS, S., REGNIER, B. b.
Etude expérimentale de l'activité tératogène du parbendazole (S.K.F. 29044) chez la souris et le lapin.
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon, 1973, **75**, 5, 309-323.
- LAPRAS, M., DESCHANEL, J.-P., DELATOUR, P., GASTELLU, J., LOMBARD, M. c.
Accidents tératologiques chez le mouton après administration de Parbendazole.
Bulletin de la Société des Sciences Vétérinaires et de Médecine Comparée de Lyon, 1973, **75**, 1, 53-61.
- LEMON, P.G., HANCOCK, H.A.
The effects of methyl-5(6)-butyl-2-benzimidazole carbamate (parbendazole) on reproduction in sheep and other animals.V. Teratological study in the U.K.
The Cornell Veterinarian, 1974, **64**, suppl.4, 77-84.

- LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., MASTROMARINO, M., LANUSSE, C.E.
Enhanced plasma availability of the metabolites of albendazole in fasted adult sheep.
Veterinary Research Communications, 1997, **21**, 201-211.
- LUBEGA, G.W., PRICHARD, R.K.
Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin : binding affinity and anthelmintic efficacy.
Experimental Parasitology, 1991, **73**, 203-213.
- LUEPKE, N.P.
Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential.
Food and chemical toxicology, 1985, **23**, 2, 287-291.
- MALONE, J.B., SMITH, P.H., LOYACANO, A.F., HEMBRY, F.G., BROCK, L.T.
Efficacy of albendazole for treatment of naturally acquired *Fasciola hepatica* in calves.
American Journal of Veterinary Research, 1982 mai, **43**, 5, 879-881.
- MANESSE, M.
Embryon de Poulet et Toxicologie du développement : contribution à la mise au point d'un modèle expérimental.
Thèse : Méd. Vét. : Toulouse : 1993 ; n°083. 67.
- MANTOVANI, A., RICCIARDI, C., STAZI, A.V., MACRI, C.
Effects observed on gestational day 13 in rat embryos exposed to albendazole.
Reproductive Toxicology, 1995 May-Jun, **9**, 3, 265-273.
- MARRINER, S.E., BOGAN, J.A.
Pharmacokinetics of Albendazole in Sheep.
American Journal of Veterinary Research, 1980 juillet, **41**, 7, 1126-1129.
- MARTIN, D.
Albendazole : étude embryotoxique de dix métabolites.
Thèse : Méd. Vét. : Lyon : 1980 ; n° 51. 51, 23-42.
- MCKELLAR, Q.A., COOP, R.L., JACKSON, F.
The pharmacokinetics of albendazole metabolites following administration of albendazole, albendazole sulfoxide, and netobimin to one-month- and eight-month-old sheep.
International Journal for Parasitology, 1995, **25**, 10, 1207-1212.
- MCKELLAR, Q.A., JACKSON, F., COOP, R.L., BAGGOT, J.D.
Plasma profiles of albendazole metabolites after administration of netobimin and albendazole in sheep : effects of parasitism and age.
British Veterinary Journal, 1993 janvier-février, **149**, 1, 101-113.
- MCKELLAR, Q.A., JACKSON, F., COOP, R.L., JACKSON, E., SCOTT, E.
Effect of parasitism with *Nematodirus battus* on the pharmacokinetics of levamisole, ivermectin and netobimin.
Veterinary Parasitology, 1991 juillet, **39**, 1-2, 123-136.
- MCKELLAR, Q.A., SCOTT, E.W.
The benzimidazole anthelmintic agents- a review.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1990 septembre, **13**, 3, 223-247.

MEANA, A., LUZON-PENA, M., SANTIAGO-MORENO, J., DE BULNES, A., GOMEZ-BAUTISTA, M.

Natural infection by gastrointestinal and bronchopulmonary nematodes in mouflons (*Ovis musimon*) and their response to netobimin treatment.

Journal of Wildlife Diseases, 1996 janvier, **32**, 1, 39-43.

MERCIER-PAROT, L.

A propos de l'action tératogène du parbendazole.

Thérapie, 1976, **31**, 491-503.

MERINO, G., ALVAREZ, A.I., REDONDO, P.A., GARCIA, J.L., PRIETO, J.G.

Bioavailability of albendazole sulphoxide after netobimin administration in sheep : effects of fenbendazole coadministration.

Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997, **20**, suppl.1, 70.

MESSIER, P.E., MATHIEU, O., BELLEMARE, M.

The effect of LSD on the histology and ultrastructure of the neuroepithelium of young chick embryos : a stereological study.

Toxicology, 1976 novembre-décembre, **6**, 3, 357-370.

MIGLIACCIO, S., NEWBOLD, R.R., BULLOCK, B.C., McLACHLAN, J.A., KORACH, K.S.

Developmental exposure to estrogens induces persistent changes in skeletal tissue.

Endocrinology, 1992, **130**, 3, 1756-1759.

MILLER, C.R., SZABO, K.T., SCOTT, G.C.

The effects of methyl-5-(6)-butyl-2-bezimidazole carbamate (parbendazole) on reproduction in sheep and other animals.VI. Effect in the pregnant cow.

The Cornell Veterinarian, 1974, **64**, suppl.4, 56-68.

MILLER, J.E., HEMBRY, F.G., KEARNEY, M.T., WILLIAMS, J.C., STAGG, L.C., SIMS, D.

Efficacy of levamisole and netobimin against *Haemonchus contortus* in lambs in Louisiana.

American Journal of Veterinary Research, 1987 septembre, **48**, 9, 1403-1406.

MISAWA, M., DOULL, J., UYEKI, E.M.

Teratogenic effects of the cholinergic insecticides in chick embryos.III. Development of cartilage and bone.

Journal of Toxicology and Environmental Health, 1982 octobre-novembre, **10**, 4-5, 551-563.

MORA, S., SIMON, F., KAPP, P.

Toxicological model investigation on chicken embryo.

Acta Veterinaria Scandinavica, 1991, Supplementum **87**, 197-198.

MORRIS, D.L., DYKES, P.W., DICKSON, B., MARRINER, S.E., BOGAN, J.A., BURROWS, F.G.O.

Albendazole in hydatid disease.

British Medical Journal, 1983, **286**, 103-104.

NAFISSI-VARCHEI, M.M.

N-alkoxycarbonyl-N(2-nitro-4 or 5 alkylthiophenyl)-N-(substitute alkyl)-guanidines useful as anthelmintics.

U.S. Patent, 1983, **4**, 406, 893.

NAVARRO, M., CANUT, L., CARRETERO, A., CRISTOFOL, C., PEREZ-APARICIO, F.J., ARBOIX, M., RUBERTE, J.

Developmental toxicity in rat fetuses exposed to the benzimidazole netobimin.
Reproductive Toxicology, 1999 juillet-août, **13**, 4, 295-302.

NAVARRO, M., CRISTOFOL, C., CARRETERO, A., ARBOIX, M., RUBERTE, J.
Anthelmintic induced congenital malformations in sheep embryos using netobimin.
The Veterinary Record, 1998 janvier, **142**, 86-90.

NAVARRO, M., CRISTOFOL, C., MANESSE, M., SAUTET, J., CARRETERO, A., PEREZ-APARICIO, F.J., ARBOIX, M., RUBERTE, J.
Study of the distribution of albendazole-sulphoxide (ABZ-SO) in fertilized egg compartments.
Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 1997, **37**, 4, 191-196.

O'BRIEN, J.J.
Toxicological aspects of some modern anthelmintics.
Australian Veterinary Journal, 1970, **46**, 297-300.

PAGEZE, L., MANESSE, M., NAVARRO, M., CARRETERO, A., ARBOIX, M., RUBERTE, J., SAUTET, J.
The morphometric study of the 19-day chicken embryo skeleton (*Gallus domesticus*).
Veterinary and Human Toxicology, 1996, **38**, 4, 299-301.

PAGEZE L.
Contribution à l'étude morphométrique du squelette de l'embryon de poulet (*Gallus domesticus*) à dix-neuf jours d'incubation.
Thèse : Méd.Vét. : Toulouse : 1995 ; n°047. 57.

PEREZ-SERRANO, J., DENEGRI, G., CASADO, N., RODRIGUEZ-CAABEIRO, F.
In vivo effect of oral albendazole and albendazole sulphoxide on development of secondary echinococcosis in mice.
International Journal for Parasitology, 1997, **27**, 11, 1341-1345.

PICARD, P.
La dictyocaulose bovine : incidence-épidémiologie-méthodes de lutte- essai de traitement à l'aide d'un nouvel anthelminthique : le nétobimin.
Thèse : Méd. Vét. : Nantes : 1991 ; n° 93. 144.

PIERCY, D.W.T., REYNOLDS, J., BROWN, P.R.M.
Reproductive safety studies of oxfendazole in sheep and cattle.
British Veterinary Journal, 1979, **135**, 405-410.

PISCOPO, S.E., FARIN, C.E., BAI, S.A.
Determination of concentration of albendazole sulfoxide in plasma and uterine fluid of heifers.
American Journal of Veterinary Research, 1997 janvier, **58**,1, 62-66.

PISCOPO, S.E., SMOAK, I.W.
Comparison of effects of albendazole sulfoxide on in vitro produced bovine embryos and rat embryos.
American Journal of Veterinary Research, 1997 septembre, **58**, 9, 1038-1042.

- PRICHARD, R.K., HENNESSY, D.R., STEEL, J.W., LACEY, E.
Metabolite concentrations in plasma following treatment of cattle with five anthelmintics.
Research in Veterinary Science, 1985, **39**, 173-178.
- PRICHARD, R.K.
Anthelmintics.
In : *Refresher course for veterinarians, Proceedings*, 1978, **39**, Vol. 1, 421-463. The University of Sydney Postgraduate Committee in Veterinary Science, Sydney.
- PRICHARD, R.K.
The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics.
International Journal for Parasitology, 1973, **3**, 409-417.
- PROZESKY, L., JOUBERT, J.P.J., EKRON, M.D.
Paralysis in lambs caused by overdosing with parbendazole.
Landbouersing (Agricultural Research), 1982, Pretoria, South Africa Department of Agriculture, **98**.
- RANZ, F.B., ACEITERO, J., GAYTAN, F.
Morphometric study of cartilage dynamics in the chick embryo tibia.II. Dexamethasone-treated embryos.
Journal of Anatomy, 1987 octobre, **154**, 73-79.
- REDONDO, P.A., ALVAREZ, A.I., GARCIA, J.L., LARRODE, O., PRIETO, J.G.
Sulphoxidation of albendazole by intestinal microsomes in gerbil, rat and lamb.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997, **20**, suppl. 1, 101.
- RICHARDS, L.S., ZIMMERMAN, G.L., HOBERG, E.P., SCHONS, D.J., DAWLEY, S.W.a.
The anthelmintic efficacy of netobimin against naturally acquired gastrointestinal nematodes in sheep.
Veterinary Parasitology, 1987, **26**, 87-94.
- RICHARDS, L.S., ZIMMERMAN, G.L., NELSON, M.J., SCHONS, D.J., DAWLEY, S.W. b
The anthelmintic efficacy of netobimin against experimental infections of *Fasciola hepatica* in sheep.
Veterinary Parasitology, 1987, **26**, 71-77.
- RICHARDS, L.S., ZIMMERMAN, G.L., WEBER, D.W., DAWLEY, S.W., NELSON, M.J., SCHONS, D.J. c.
Anthelmintic efficacy of netobimin against naturally acquired gastrointestinal nematodes in yearling heifers.
Veterinary Parasitology, 1987, **26**, 79-85.
- RICHARDSON, M.K.
Une fraude en embryologie.
Pour la Science, 1998 mai, **247**, 62-69.
- RICHARDSON, M.K., HANKEN, J., GOONERATNE, M.L., PLEAU, C., RAYNAUD, A., SELWOOD, L., WRIGHT, G.M.
There is no highly conserved embryonic stage in the vertebrates : implications for current theories of evolution and development.
Anatomy and Embryology, 1997, **196**, 91-106.

- ROJO-VAZQUEZ, F.A., MEANA, A., TARAZONA, J.M., DUNCAN, J.L.
The efficacy of netobimin, 15 mg/kg, against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep.
The Veterinary Record, 1989 mai, **124**, 512-513.
- ROLFE, P.F., BORAY, J.C.
Chemotherapy of paramphistomosis in sheep.
Australian Veterinary Journal, 1988 mai, **65**, 5, 148-150.
- ROSS, D.B., EICHLER, D.A., CAMERON, D.
The effect of albendazole on nematode parasites in experimentally infected lambs.
The Veterinary Record, 1978 juin, **102**, 556-557.
- SANTIAGO, M.A., DA COSTA, U.C., BENEVENGA, S.F.
Netobimin (Totabin-SCH) efficacy in ruminants in Rio Grande Do Sud Brazil.
World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 1985, **130**, 30.
- SANYAL, P.K. a.
Disposition kinetics of albendazole in goat compared to sheep.
Indian Veterinary Journal, 1997, **74**, 213-216.
- SANYAL, P.K. b.
Disposition kinetics of albendazole in buffalo and cattle.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997, **20**, 240-242.
- SANZ, F., TARAZONA, J.M., JURADO, R., FRIAS, J., TARAZONA, J.V., DUNCAN, J.L.
An evaluation of the efficacy of netobimin against *Dicrocoelium dendriticum* in sheep.
The Veterinary Record, 1987 janvier, **120**, 3, 57-58.
- SAUVEUR, B.
Reproduction des volailles et production d'œufs.
Paris : *INRA*, 1988. 449.
- SATTERLEE, D.G., ROBERTS, E.D.
Estradiol-17 β -Induced morphometric changes in chick embryo femurs.
Poultry Science, 1987, **66**, 552-557.
- SMITH, R.E., TORGERSEN, J., LONG, P.H., MAURER, J.K.
Lethality and bone alterations in chicken embryos and newly hatched chickens given bone-active agents.
American Journal of Veterinary Research, 1988 août, **49**, 8, 1376-1381.
- SOLANA, H., NAJLE, R., LANUSSE, C.E., RODRIGUEZ, J.
Studies on effects of albendazole on rat brain tubulin : microtubule dynamics and tyrosination pattern.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997 juillet, **20**, suppl.1, 263-264.
- STOKOL, T., RANDOLPH, J.F., NACHBAR, S., RODI, C., BARR, S.C.
Developpment of bone marrow toxicosis after albendazole administration in a dog and cat.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 1997 juin, **210**, 12, 1753-1756.
- TALON, E. 1989.
Métabolisme du nétohimin chez le mouton après administration IM et IV.
Thèse : Méd. Vét. : Lyon : 1989 ; n° 124. 88.

- THEODORIDES, V.J., CARAKOSTAS, M.C., COLAIANNE, J.J., FREEMAN, J.F., PAGE, S.W.
Safety of albendazole in developing bovine fetuses.
American Journal of Veterinary Research, 1993 décembre, **54**, 12, 2171-2174.
- THEODORIDES, V.J., FREEMAN, J.F.
Efficacy against *Fasciola hepatica* in cattle.
The Veterinary Record, 1980 janvier, **106**, 78-79.
- THEODORIDES, V.J., GYURIK, R.J., KINGSBURY, W.D., PARISH, R.C. a.
Anthelmintic activity of albendazole against liver flukes, tapeworms, lung and gastrointestinal roundworms.
Experientia, 1976 juin, **32**, 6, 702-703.
- THEODORIDES, V.J., NAWALINSKI, T., CHANG, J. b.
Efficacy of albendazole against *Haemonchus*, *Nematodirus*, *Dictyocaulus*, and *Moniezia* of sheep.
American Journal of Veterinary Research, 1976 décembre, **37**, 12, 1515-1516.
- THEODORIDES, V.J., NAWALINSKI, T., MURPHY, J., FREEMAN, J. c.
Efficacy of albendazole against gastrointestinal nematodes of cattle.
American Journal of Veterinary Research, 1976 décembre, **37**, 12, 1517-1518.
- THEODORIDES, V.J., CHANG., J., DICUIOLLO, C.J., GRASS, G.M., PARISH, R.C., SCOTT, G.C.
Oxibendazole : a new broad spectrum anthelmintic effective against gastrointestinal nematodes of domestic animals.
British Veterinary Journal, 1973, **129**, 97.
- TUCHMANN-DUPLESSIS, H., MERCIER-PAROT, L.
Difficultés d'interprétation rencontrées au cours de l'étude tératogène d'un même sédatif.
Comptes-rendus des Séances de la Société de Biologie, 1965, **159**, 6-10.
- VIEIRA, L.S., BERNE, M.E.A., CAVALCANTE, A.C.R., COSTA, C.A.F.
Haemonchus contortus resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep.
Veterinary Parasitology, 1992 décembre, **45**, 1-2, 111-116.
- VIRKEL, G., LIFSCHITZ, A., PIS, A., LANUSSE, C.E.
Influence of diet on the pattern of gastrointestinal biotransformation of netobimin and albendazole sulphoxide in sheep.
European Journal of Drug Metabolism Pharmacokinetics, 1999 janvier-mars, **24**, 1, 31-37.
- VIRKEL, G., LIFSCHITZ, A., PIS, A., SALLOVITZ, J., LANUSSE, C.E.
Diet affects the ruminal biotransformation of netobimin and albendazole sulphoxide.
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1997, **20**, 100-101.
- WHITTAKER, S.G., FAUSTMAN, E.M.
Effects of albendazole and albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells.
Toxicology and Applied Pharmacology, 1991 juin, **109**, 1, 73-84.

- WILLIAMS, J.C., DEROSA, A., NAKAMURA, Y., LOYACANO, A.F.
Comparative efficacy of ivermectin pour-on, albendazole, oxfendazole and fenbendazole against *Ostertagia ostertagi* inhibited larvae, other gastrointestinal nematodes and lungworm of cattle.
Veterinary Parasitology, 1997, **73**, 73-82.
- WILLIAMS, J.C., KNOX, J.W., MARBURY, K.S., KIMBALL, M.D., WILLIS, E.R., SNIDER, T.G., MILLER, J.E.
Efficacy of the tris-salt of 2[(methoxycabonylamino)-[2-nitro-5-(n-propylthio) phenylimino] methylamino] ethane sulfonic acid against inhibited larvae of *Ostertagia ostertagi*.
American Journal of Veterinary Research, 1985 octobre, **46**, 10, 2188-2192.
- WILLIAMS, J.C., KNOX, J.W., SHEEHAN, D., FUSELIER, R.H. a.
Efficacy of albendazole against inhibited early fourth stage larvae of *Ostertagia ostertagi*.
The Veterinary Record, 1977 décembre, **101**, 24, 484-486.
- WILLIAMS, J.C., SHEEHAN, D., FUSELIER, R.H. b.
Effect of albendazole on gastrointestinal parasites of cattle.
American Journal of Veterinary Research, 1977 décembre, **38**, 12, 2037-2038.
- WILSON, J.G.
Review of in vitro systems with potential for use in teratogenicity screening.
Journal of Environmental Pathology and Toxicology, 1978 septembre-octobre, **2**, 1, 149-167.
- WILSON, J.G., WARKANY, J.
Teratology. Principles and techniques.
The University of Chicago Press, Chicago and London, 1965.
- YAZWINSKI, T.A., FEATHERSTON, H., JOHNSON, Z.
Efficacy of netobimin against naturally acquired helminth infections in cattle.
The Veterinary Record, 1992 septembre, **131**, 219-220.

Liste bibliographique des textes officiels :

- 1- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article L.617-1.
- 2- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article L.617-2.
- 3- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article L.617-18.
- 4- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-18.
- 5- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-19.
- 6- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-25.
- 7- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-26.
- 8- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-28-1.
- 9- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-29.
- 10- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-30.
- 11- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-31.
- 12- FRANCE : Code de la Santé Publique. Article R.5146-34.

- 13- FRANCE : Ministère de l'Agriculture et Ministère de la Santé et de la Sécurité Sociale. Arrêté du 4 juillet 1977 concernant le protocole applicable aux essais analytiques des médicaments vétérinaires. *Journal Officiel* du 30 juillet 1977, p.4564 N.C.

- 14- FRANCE : Ministère de l'Agriculture et Ministère de la Santé et de la Sécurité Sociale. Arrêté du 4 juillet 1977 concernant le protocole applicable aux essais toxicologiques et pharmacologiques des médicaments vétérinaires. *Journal Officiel* du 30 juillet 1977, p.4566 N.C.

- 15- FRANCE : Ministère de l'Agriculture et Ministère de la Santé et de la Sécurité Sociale. Arrêté du 4 juillet 1977 concernant le protocole applicable aux essais cliniques des médicaments vétérinaires. *Journal Officiel* du 30 juillet 1977, p.4564 N.C.

- 16- FRANCE : Ministère des affaires sociales, de la santé et de la ville ; Ministère de l'agriculture et de la pêche. Arrêté ministériel du 5 septembre 1994 fixant les normes et protocoles applicables aux essais analytiques, toxicologiques, pharmacologiques et cliniques en matière d'essais de médicaments vétérinaires. *Journal Officiel* du 29 septembre 1994, p. 13750.

- 17- FRANCE : Textes généraux, ministère du travail et des affaires sociales. Arrêté du 9 décembre 1996 fixant les normes et protocoles applicables aux essais analytiques, aux essais toxicologiques et pharmacologiques ainsi qu'à la documentation clinique auxquels sont soumis les médicaments ou produits mentionnés à l'article L.601 du code de la santé publique. *Journal Officiel* n°303 du 29 décembre 1996, p. 19401.

- 18- FRANCE : Ministère de l'emploi et de la solidarité ; Ministère de l'agriculture et de la pêche ; Ministère de la santé. Arrêté du 14 mars 2000 portant application de la directive 1999/82/CE de la Commission du 8 septembre 1999 et modifiant l'arrêté du 9 décembre 1996 fixant les normes et protocoles applicables aux essais analytiques, aux essais toxicologiques et pharmacologiques ainsi qu'à la documentation clinique auxquels sont soumis les médicaments ou produits mentionnés à l'article L.601 du code de la santé publique.- *Journal Officiel* n°65 du 17 Mars 2000, p. 04153.

- 19- FRANCE : Ministère de l'emploi et de la solidarité ; Ministère de l'agriculture et de la pêche ; Ministère de la santé. Arrêté du 24 janvier 2001 portant application de la directive 1999/104/CE de la Commission du 22 décembre 1999 et modifiant l'arrêté du 5 septembre 1994 fixant les normes et protocoles applicables aux essais analytiques, toxicologiques,

- pharmacologiques et cliniques en matière d'essais de médicaments vétérinaires. *Journal Officiel n°32* du 7 février 2001, p. 2066.
- 20- FRANCE : Assemblée nationale et Sénat. Loi n° 94-114 du 10 février 1994 portant diverses dispositions concernant l'agriculture. *Journal Officiel n°35* du 11 février 1994, p. 2326.
- 21- FRANCE : Assemblée nationale et Sénat. Loi n° 92-650 du 13 juillet 1992 modifiant le chapitre III du titre II du livre V du code de la santé publique relatif à la pharmacie vétérinaire. *Journal Officiel n°163* du 16 juillet 1992, p. 9513.
- 22- C.E.E. : Directive 81/851/CEE du Conseil du 28 septembre 1981 concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux médicaments vétérinaires. *Journal Officiel.C.E. n°L.317* du 6 novembre 1981, p. 1.
- 23- C.E.E. : Directive 81/852/CEE du Conseil du 28 septembre 1981 relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les normes et protocoles analytiques, toxico-pharmacologiques et cliniques en matière d'essais de médicaments vétérinaires. *Journal Officiel. n°L.317* du 6 novembre 1981, p. 16.
- 24- C.E.E. : Directive 90/676/CEE du Conseil du 13 décembre 1990 modifiant la directive 81/851/CEE concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux médicaments vétérinaires. *Journal Officiel C.E. n°L.373* du 31 décembre 1990, p. 15.
- 25- C.E.E. : Directive 92/18/CEE de la Commission du 20 mars 1992, modifiant l'annexe de la directive 81/852/CEE du Conseil relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les normes et protocoles analytiques, toxico-pharmacologiques et cliniques en matière d'essais de médicaments vétérinaires. *Journal Officiel C.E. n°L.097* du 10 avril 1992, p. 0001-0023.
- 26- C.E.E. : Directive 93/40/CEE du Conseil du 14 juin 1993 modifiant la directive 90/676/CEE concernant le rapprochement des législations des Etats membres relatives aux médicaments vétérinaires. *Journal Officiel C.E. n°L.214/31* du 24 août 1993, p. 0031-0039.
- 27- C.E.E. : Directive 1999/104/CE de la Commission du 22 décembre 1999, modifiant l'annexe de la directive 81/852/CEE du Conseil relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les normes et protocoles analytiques, toxico-pharmacologiques et cliniques en matière d'essais de médicaments vétérinaires. *Journal Officiel.n°L.003* du 6 janvier 2000, p. 0018-0020.
- 28- C.E.E. : Directive 2000/37/CE de la Commission du 5 juin 2000, modifiant le chapitre VI bis de la directive 81/851/CEE du Conseil concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux médicaments vétérinaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). *Journal officiel n° L 139* du 10 juin 2000, p. 0025 - 0027
- 29- C.E.E. :Règlement (CEE) n° 2309/93 du Conseil, du 22 juillet 1993, établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance des médicaments à usage humain et à usage vétérinaire et instituant une agence européenne pour l'évaluation des médicaments *Journal officiel n° L 214* du 24 août 1993, p. 0001 – 0021

Annexe A : tableau de données brutes pour la répétabilité des mesures.

Les tibiotarses droit et gauche de 7 embryons de l'expérience 1 ont été mesuré 5 fois par le même opérateur mais des jours différents. Ainsi, pour chaque paramètre morphométrique (périmètre, surface, grand et petit diamètre de fêrêt) et pour chacun des deux tibiotarses de l'embryon, il correspond cinq mesures (en mm ou mm² pour les surfaces).

N° de l'embryon et côté mesuré	Périmètre	Surface	Grand Diamètre de Fêrêt	Petit Diamètre de Fêrêt
1 droit	32,53	18,74	13,52	1,94
	34,02	17,94	13,38	2,18
	35,11	19,27	13,46	2,71
	31,63	19,76	13,22	2,29
	32,73	18,52	13,31	1,96
1 gauche	34,55	18,47	13,49	2,6
	33,71	19,41	13,24	2,16
	34,38	19,08	13,15	2,59
	33,67	18,31	13,35	2,36
	30,29	18,19	12,69	1,9
2 droit	40,7	27,2	17,07	3,32
	40,46	26,28	17,02	3,01
	40,42	28,41	17,04	2,56
	40,18	27,65	17,08	2,99
	40,69	27,36	17,17	3,58
2 gauche	42,45	23,3	17,18	2,29
	41,74	22,77	17,02	1,86
	42,49	23,96	17,24	1,87
	42,75	23,81	17,12	2,47
	41,92	23,68	17,15	2,23
3 droit	37,49	22,74	16,04	2,94
	37,47	22,44	15,89	2,04
	37,42	23,51	16,02	2,03
	37,21	22,51	15,94	2,06
	37,58	23,25	16,02	2,29
3 gauche	39,07	24,51	15,98	2,95
	39,55	24,85	16,12	2,81
	37,98	25,16	16,05	2,36
	37,21	22,74	15,91	2,32
	36,72	23,5	15,84	2,71
4 droit	38,23	24,49	16,42	2,1
	39,18	24,31	16,41	2,99
	39,12	23,64	16,42	2,1
	38,64	25,19	16,45	2,32
	39	24,34	16,43	2,21
4 gauche	39,76	25,97	16,67	3,14
	40,54	24,08	16,44	2,11
	42,21	24,59	16,7	2,72
	39,47	25,15	16,55	2,67
	40,51	24,7	16,53	2,25
5 droit	31,85	21,64	13,32	3,01
	32,46	19,74	13,21	2,03
	32,24	19,29	13,26	2,02
	32,15	18,18	13,32	1,95
	31,86	18,68	13,15	2,13
5 gauche	33,94	18,23	13,16	2,59
	33,52	18,81	13,2	2,03
	31,92	19,51	13,27	2,31
	33,67	18,9	13,26	2
	34,16	19,09	13,24	2,67

N° de l'embryon et côté mesuré	Périmètre	Surface	Grand Diamètre de Férêt	Petit Diamètre de Férêt
6 droit	37,68	21,89	15,92	2,37
	38,2	21,51	15,87	3,01
	38,01	22,17	16	1,96
	37,45	21,03	15,92	1,95
	37,91	22,54	16,14	2,68
6 gauche	39,47	21,26	15,88	2,26
	39,68	21,9	15,87	2,32
	41,91	20,75	15,89	2,4
	38,36	22,12	15,84	2,64
	38,82	21,66	15,75	2,16
7 droit	40,48	23,35	16,97	2,07
	39,31	24,13	16,9	2,65
	39,51	24,15	16,91	3,06
	39,53	23,32	17,05	2,02
	40,34	22,75	16,88	2,09
7 gauche	43,74	30,31	17,09	3,13
	43,14	29,32	17,17	2,97
	44,95	30,27	17,07	3,08
	44,5	30,77	17,1	2,9
	44,24	30,93	17,06	3,91

Annexe B : Tableau de données brutes pour l'expérience n°1.

Toutes les mesures sont exprimées en mm ou mm² pour les surfaces.

Remarque : lorsque les mesures ne sont pas inscrites dans le tableau, c'est que l'os considéré n'était pas exploitable d'un point de vue technique (fracture, os non mesurable car cassé lors du transport ou défaut de coloration...). Dans ce cas, les mesures n'entrent pas en compte dans l'analyse de la variance.

EMBRYON	TRAITE- -MENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
1	Témoïn	droite	Fémur	24,02	12,92	9,92
		gauche		23,27	13,68	9,93
		droite	Tibiotarse	32,5	18,48	13,66
		gauche		33,6	19,83	13,34
		droite	Tarsométatarse	24,77	12,52	10,39
		gauche		24,89	13,26	10,41
		droite	Humérus	16,91	8,18	6,72
		gauche		16,5	6,7	6,83
		droite	Radius	14,3	3,88	6,18
		gauche		14,13	3,16	6,27
		droite	Ulna	15,54	5,86	6,45
		gauche		15,73	4,65	6,64
		droite	Métacarpe	9,65	3,04	4,24
		gauche		10,16	2,53	4,34
2	Témoïn	droite	Fémur	17,6	7,55	7,27
		gauche		16,78	6,66	7,07
		droite	Tibiotarse			
		gauche		22,46	8,63	10,02
		droite	Tarsométatarse			
		gauche		16,82	5,49	7,51
		droite	Humérus			
		gauche				
		droite	Radius			
		gauche				
		droite	Ulna			
		gauche				
		droite	Métacarpe			
		gauche				
3	Témoïn	droite	Fémur	30,67	17,93	12,49
		gauche		28,6	18,56	11,93
		droite	Tibiotarse	39,37	23,71	17,09
		gauche		41,63	23,93	16,79
		droite	Tarsométatarse	32,79	17,76	12,51
		gauche		28,74	15,26	12,55
		droite	Humérus	20,62	10,82	8,01
		gauche		21,67	10,41	7,69
		droite	Radius	17,31	4,19	6,96
		gauche		16,83	4,33	7,15
		droite	Ulna	17,46	7,34	7,3
		gauche		17,98	7,14	7,54
		droite	Métacarpe	12,09	3,56	4,9
		gauche		11,02	2,87	4,78

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
4	Témoïn	droite	Fémur	29,33	14,87	11,24
		gauche		30,42	16,56	11,61
		droite	Tibiotarse	37,5	21,17	16,15
		gauche		37,18	23,53	15,98
		droite	Tarsométatarse	30,23	13,23	12,21
		gauche		30,68	23,27	12,15
		droite	Humérus	18,4	9,57	7,45
		gauche		20,54	11,02	7,89
		droite	Radius	15,88	3,65	6,81
		gauche		15,98	3,6	6,78
		droite	Ulna	18,1	7	7,17
		gauche		17,12	6,55	7,22
droite	Métacarpe	10,56	3,67	4,51		
gauche		11,34	3,5	4,74		
5	Témoïn	droite	Fémur	29,53	17,53	11,62
		gauche		30,95	16,02	11,52
		droite	Tibiotarse	38,58	24,76	16,57
		gauche		38,15	23,91	16,52
		droite	Tarsométatarse	32,4	14,88	12,63
		gauche		30,27	15,75	12,78
		droite	Humérus	19,96	9,59	8,01
		gauche		20,89	11,33	8,19
		droite	Radius	16,34	2,98	7
		gauche		17,37	4,53	7,46
		droite	Ulna	17,87	6,38	7,51
		gauche		18,09	6,92	7,56
droite	Métacarpe	12,66	3,77	4,9		
gauche		12,22	3,96	5,1		
6	Témoïn	droite	Fémur	24,55	12,52	9,75
		gauche		25,28	13,93	10,34
		droite	Tibiotarse	31,03	18,14	13,15
		gauche		33,35	19,19	13,18
		droite	Tarsométatarse	22,93	11,47	9,96
		gauche		25,01	13,99	10,1
		droite	Humérus	16,62	7,39	6,75
		gauche		16,19	5,71	6,66
		droite	Radius	14,37	3,56	6,19
		gauche				
		droite	Ulna	15,5	5,64	6,47
		gauche				
droite	Métacarpe	10,35	3,6	4,29		
gauche						
7	Témoïn	droite	Fémur	27,4	14,83	11,07
		gauche		27,85	16,15	11,52
		droite	Tibiotarse	37,63	22,02	16,1
		gauche		39,24	22,77	15,97
		droite	Tarsométatarse	29,05	13,93	11,73
		gauche		26,94	14,16	11,9
		droite	Humérus	20,56	8,04	7,48
		gauche		19,36	9,76	7,79
		droite	Radius	15,03	3,34	6,7
		gauche		16,46	4,43	7,02
		droite	Ulna	16,28	5,76	6,88
		gauche		16,97	6,62	7,17
droite	Métacarpe	9,92	2,67	4,17		
gauche		11,32	4,06	4,8		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
8	Témoïn	droite	Fémur	29,98	17,45	11,88
		gauche		31,2	21,02	12,71
		droite	Tibiotarse	39,36	23,69	16,97
		gauche		39,62	24,83	17,14
		droite	Tarsométatarse	29,74	15,96	12,45
		gauche		30,72	22,4	12,62
		droite	Humérus	18,28	6,76	7,66
		gauche		19,98	10,4	7,89
		droite	Radius	15,3	3,3	6,69
		gauche		15,14	3,56	6,58
		droite	Ulna	17,13	5,61	7,32
		gauche		17,45	5,97	7,03
droite	Métacarpe	10,71	3,06	4,65		
gauche		11,64	3,73	4,71		
9	Témoïn	droite	Fémur	22,25	9,86	8,79
		gauche		21,23	10,14	9,08
		droite	Tibiotarse			
		gauche		27,63	13,94	12,27
		droite	Tarsométatarse	20,29	9,51	8,81
		gauche		20,22	8,92	8,96
		droite	Humérus	14,99	6,23	6,28
		gauche		15,58	5,99	6,45
		droite	Radius	13,43	2,58	5,84
		gauche		14,83	3,05	5,94
		droite	Ulna	15,08	4,62	6,31
		gauche		15,98	4,32	6,16
droite	Métacarpe	9,7	2,51	3,95		
gauche		9,11	2,13	3,87		
10	Témoïn	droite	Fémur	28,89	19,58	12,35
		gauche		29,67	19,51	12,24
		droite	Tibiotarse	40,08	27,82	17,49
		gauche		42,46	28,67	17,63
		droite	Tarsométatarse	30,15	21,26	12,81
		gauche		29,94	16,87	13,25
		droite	Humérus	20,53	9,8	8,15
		gauche		20,7	12,16	8,2
		droite	Radius	18,43	4,84	7,42
		gauche		17,31	4,61	7,46
		droite	Ulna	21,67	8,02	7,97
		gauche		19,1	8,07	7,78
droite	Métacarpe	12,6	3,58	5,08		
gauche		12,95	5,06	5,44		
1	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	23,03	13,87	9,86
		gauche		24,31	15,33	10,46
		droite	Tibiotarse	38,2	21,39	15,49
		gauche		33,99	22,13	15,23
		droite	Tarsométatarse	30,91	15,15	11,79
		gauche		25,87	14,96	11,35
		droite	Humérus	17,98	8,75	6,96
		gauche		17,57	9,01	7,02
		droite	Radius	14,56	3,06	6,17
		gauche		14,89	3,16	6,55
		droite	Ulna	15,63	5,66	6,51
		gauche		16,07	5,91	6,83
droite	Métacarpe	10,48	2,77	4,29		
gauche		11,13	3,38	4,56		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
2	Témoins fenêtre	droite	Fémur	24,48	11,91	9,42
		gauche		23,78	12,99	9,85
		droite	Tibiotarse	30,65	16,02	12,88
		gauche		33,25	17,31	13,14
		droite	Tarsométatarse	24	10,55	9,75
		gauche		21,86	10,44	9,56
		droite	Humérus	16,54	7,54	6,47
		gauche		15,22	6,46	6,45
		droite	Radius	13,14	2,87	5,66
		gauche		11,72	2,58	5,23
		droite	Ulna	14,09	4,96	5,9
		gauche		12,88	3,99	5,64
droite	Métacarpe	9,13	2,38	3,87		
gauche		8,82	2,44	3,89		
3	Témoins fenêtre	droite	Fémur	25,41	15	10,94
		gauche		25,57	14,87	10,57
		droite	Tibiotarse	34,43	22,15	14,87
		gauche		37,4	20,87	14,76
		droite	Tarsométatarse	26,8	15,19	11,45
		gauche		28,69	14,07	11,51
		droite	Humérus	17,59	8,02	7,36
		gauche		18,53	8,48	7,34
		droite	Radius	14,35	3,24	6,04
		gauche		15,7	3,77	6,36
		droite	Ulna	16,55	5,89	6,76
		gauche		17,07	6,14	6,79
droite	Métacarpe	11,65	3,36	4,48		
gauche		10,92	3,42	4,74		
4	Témoins fenêtre	droite	Fémur	27,2	15,5	11,04
		gauche		26,64	15,43	11,08
		droite	Tibiotarse	35,19	20,71	15,17
		gauche		38,14	21,95	15,28
		droite	Tarsométatarse	27,14	14,81	11,46
		gauche		27,46	12,47	11,61
		droite	Humérus	17,13	6,91	7,14
		gauche		18,59	10,08	7,45
		droite	Radius	14,15	3,06	6,2
		gauche		14,93	2,92	6,48
		droite	Ulna	15,84	4,92	6,78
		gauche		16,7	5,98	7,06
droite	Métacarpe	9,84	2,43	4,19		
gauche		11,11	3,29	4,6		
5	Témoins fenêtre	droite	Fémur	26,04	12,68	10,26
		gauche		25,44	15,83	10,85
		droite	Tibiotarse	34,31	19,36	14,59
		gauche		33,16	20,25	14,76
		droite	Tarsométatarse	25,94	12,7	11,14
		gauche		25,28	12,57	11,11
		droite	Humérus	18,67	8,12	7,29
		gauche		18,15	9,17	7,13
		droite	Radius	14,97	3,91	6,39
		gauche		14,26	3,17	6,25
		droite	Ulna	16,48	5,82	6,86
		gauche		16,91	6,12	7,09
droite	Métacarpe					
gauche		10,23	2,9	4,48		

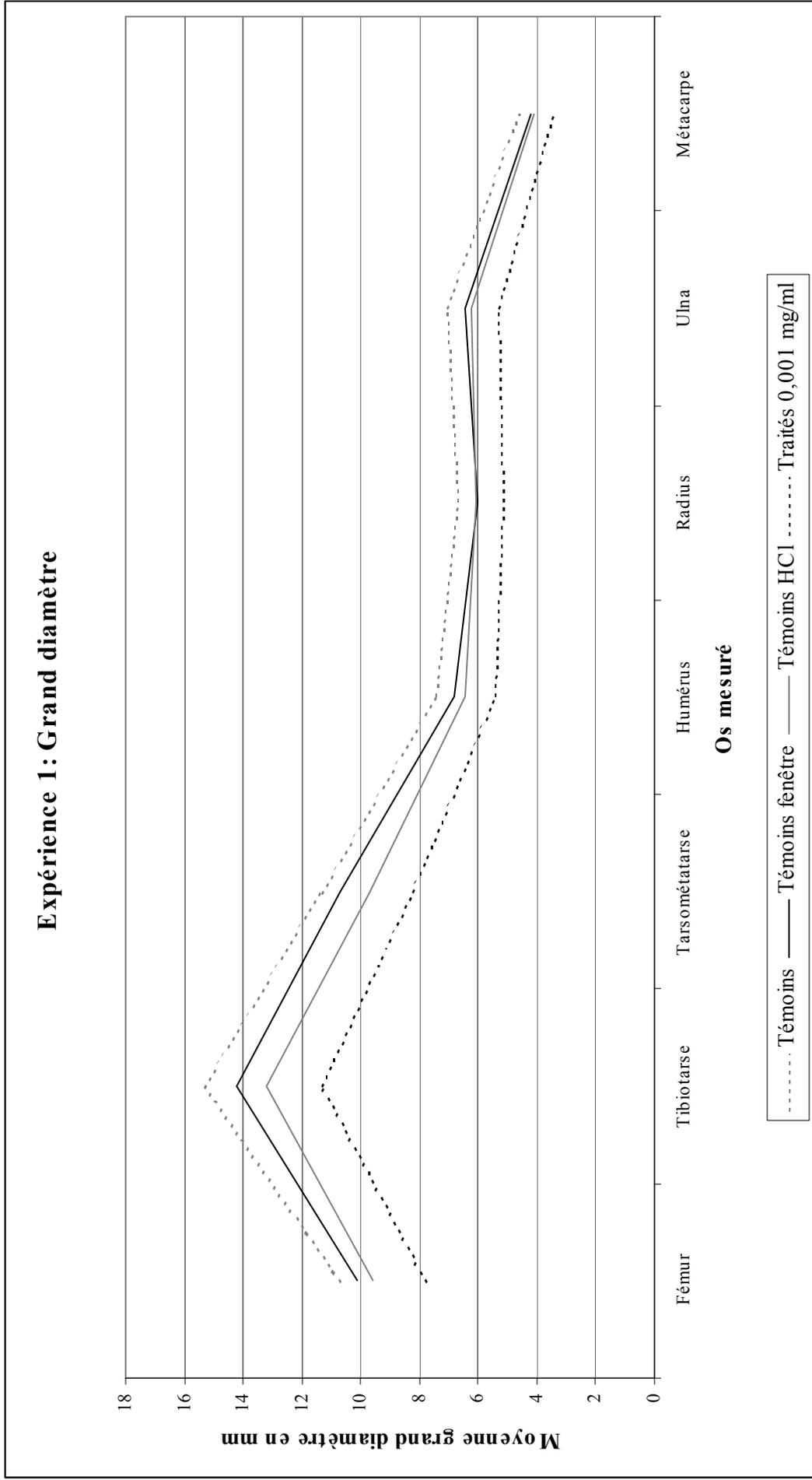
EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
6	Témoine fenêtré	droite	Fémur	20,58	9,34	8,44
		gauche		21,69	10,96	8,66
		droite	Tibiotarse	30,16	16,03	12,21
		gauche		30,6	14,92	12,04
		droite	Tarsométatarse	20,91	8,11	8,82
		gauche		22,25	7,94	9,08
		droite	Humérus	14,47	5,24	6,05
		gauche		12,93	4,18	5,29
		droite	Radius	12,55	2,67	5,39
		gauche		12,43	2,91	5,36
		droite	Ulna	13,24	3,88	5,58
		gauche		13,53	5,03	5,54
droite	Métacarpe	8,65	2,06	3,66		
gauche		9,11	2,65	3,77		
1	Témoine HCl	droite	Fémur	23,26	11,35	9,44
		gauche		26,86	15,35	10,39
		droite	Tibiotarse	30,91	16,08	12,91
		gauche		34,51	19,06	13,24
		droite	Tarsométatarse	22,79	10,26	9,58
		gauche		23,74	13,77	9,74
		droite	Humérus	15,88	6,47	6,61
		gauche		17,62	8	6,65
		droite	Radius	14,44	3,99	6,42
		gauche		13,88	3,44	6,18
		droite	Ulna	14,92	5,1	6,31
		gauche		15,02	5,57	6,44
droite	Métacarpe	9,51	2,8	4,03		
gauche		10,29	2,85	4,41		
2	Témoine HCl	droite	Fémur	16,56	6,96	7,26
		gauche		18,32	7,01	7,08
		droite	Tibiotarse	24,75	11,76	10,96
		gauche		25,97	10,63	10,79
		droite	Tarsométatarse	18,03	7,05	7,87
		gauche		17,51	6,82	7,94
		droite	Humérus	11,06	3,62	4,97
		gauche		11,39	2,93	4,65
		droite	Radius	11,22	2,35	4,95
		gauche		11,58	2,57	5,31
		droite	Ulna	11,7	3,41	5,04
		gauche		11,81	3,29	5,16
droite	Métacarpe	7,53	1,66	3,33		
gauche		7,81	1,6	3,18		
3	Témoine HCl	droite	Fémur	22,2	10,99	8,51
		gauche		19,27	9,8	8,29
		droite	Tibiotarse	30,35	17,86	11,86
		gauche		25,9	13,23	11,54
		droite	Tarsométatarse	19,67	5,51	8,71
		gauche		18,97	7,56	8,51
		droite	Humérus	14,34	5,41	5,81
		gauche		14,47	5,77	5,77
		droite	Radius	13,05	3,11	5,61
		gauche		11,83	2,43	5,26
		droite	Ulna	13,59	4,39	5,67
		gauche		13	4,36	5,49
droite	Métacarpe	8,58	2,54	3,62		
gauche		8,7	2,04	3,63		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
4	Témoin HCl	droite	Fémur	26,28	13,44	10,2
		gauche		26,32	14,69	10,74
		droite	Tibiotarse	36,99	18,39	14,73
		gauche		36,42	19,3	14,48
		droite	Tarsométatarse	34,12	11,99	10,79
		gauche		23,54	11,58	10,3
		droite	Humérus	18,66	7,65	7,17
		gauche		17,85	7,96	7,32
		droite	Radius	15,4	2,83	6,06
		gauche		16,44	3,62	6,67
		droite	Ulna	16,53	5,66	6,63
		gauche		15,41	4,16	6,68
droite	Métacarpe	9,94	2,87	4,24		
gauche		9,77	2,76	4,39		
5	Témoin HCl	droite	Fémur	24,66	15,88	10,55
		gauche		25,5	15,96	10,97
		droite	Tibiotarse	32,41	20,26	14,49
		gauche		37,32	19,6	14,71
		droite	Tarsométatarse	23,88	13,9	10,6
		gauche		25,44	20,2	10,83
		droite	Humérus	16,85	7,31	7,11
		gauche		17,72	7,08	7,27
		droite	Radius	14,56	3,63	6,68
		gauche		14,61	3,26	6,54
		droite	Ulna	15,79	5,64	6,91
		gauche		15,62	5,96	6,74
droite	Métacarpe	10,35	3,19	4,52		
gauche		10,26	2,33	4,7		
6	Témoin HCl	droite	Fémur	24,69	15,68	10,87
		gauche		24,5	15,13	10,46
		droite	Tibiotarse	32,88	21,59	14,36
		gauche		31,68	19,96	14,1
		droite	Tarsométatarse	24,02	14,51	10,54
		gauche		27,3	18,61	11,06
		droite	Humérus	16,43	7,17	7,14
		gauche		17,13	7,95	7,13
		droite	Radius	14,84	3,23	6,54
		gauche		14,53	3,54	6,5
		droite	Ulna	16	5,53	6,72
		gauche		16,36	5,71	6,75
droite	Métacarpe	10,07	2,52	4,5		
gauche		9,96	2,32	4,37		
1	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	23,31	12,96	9,79
		gauche		22,52	12,44	9,68
		droite	Tibiotarse	31,02	18,39	13,57
		gauche		31,17	19,5	13,73
		droite	Tarsométatarse	24,62	14,34	10,61
		gauche		24,19	13,79	10,28
		droite	Humérus	17,3	7,93	6,67
		gauche		16,03	6,89	6,51
		droite	Radius	14,55	3,14	6,1
		gauche		13,86	3,14	5,92
		droite	Ulna	16	5,45	6,48
		gauche		15,22	5,18	6,26
droite	Métacarpe	10,93	3,11	4,38		
gauche		10,52	3,13	4,4		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
2	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	17,11	6,61	6,89
		gauche		16,77	8,07	7,21
		droite	Tibiotarse	21,87	8,97	9,5
		gauche		23,36	9,75	10,4
		droite	Tarsométatarse	16,79	5,5	7,36
		gauche		16,89	6,14	7,45
		droite	Humérus	11,83	3,9	4,93
		gauche		11,71	3,91	5
		droite	Radius	10,59	2,18	4,56
		gauche		11,18	2,49	4,93
		droite	Ulna	10,89	3,07	4,62
		gauche		11,8	3,63	4,94
droite	Métacarpe	7,03	1,32	3,06		
gauche		7,69	1,8	3,23		
3	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	17,33	6,49	6,73
		gauche		16,19	6,45	6,75
		droite	Tibiotarse	23,16	9,12	9,9
		gauche				
		droite	Tarsométatarse	16,51	5,97	6,97
		gauche		18,03	8,28	7,23
		droite	Humérus	11,29	3,6	4,74
		gauche		11,39	3,66	4,85
		droite	Radius	10,47	2,15	4,72
		gauche		11,21	2,39	5,03
		droite	Ulna	11,45	2,93	4,84
		gauche		11,59	3,15	4,92
droite	Métacarpe	7,14	1,44	3,16		
gauche		7,34	1,59	3,12		
4	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	13,39	5,3	5,54
		gauche		13,8	5,49	5,83
		droite	Tibiotarse	20,43	6,99	8,94
		gauche		23,14	10,64	9,06
		droite	Tarsométatarse	14,5	5,04	6,39
		gauche		13,94	3,78	6,25
		droite	Humérus	9,56	2,59	3,94
		gauche		9,35	2,81	4,08
		droite	Radius	8,63	1,75	3,79
		gauche		9,36	1,82	4,2
		droite	Ulna	8,95	2,1	3,85
		gauche		10,34	2,43	4,58
droite	Métacarpe	4,45	0,67	1,96		
gauche		5,9	1,08	2,57		
5	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	22,48	13,16	9,47
		gauche		23,99	13,53	9,88
		droite	Tibiotarse	31,07	17,49	13,49
		gauche		31,55	17,21	13,65
		droite	Tarsométatarse	23,36	11,76	9,95
		gauche		23,99	10,32	10,16
		droite	Humérus	15,31	6,16	6,61
		gauche		16,47	7,59	6,89
		droite	Radius	13,91	3,73	6,08
		gauche		14,34	3,72	6,13
		droite	Ulna	15,36	5,23	6,37
		gauche		14,89	5,04	6,25
droite	Métacarpe	10,1	2,85	4,27		
gauche		10,45	3,11	4,28		

Annexe C : Représentation graphique expérience n°1, grand diamètre.

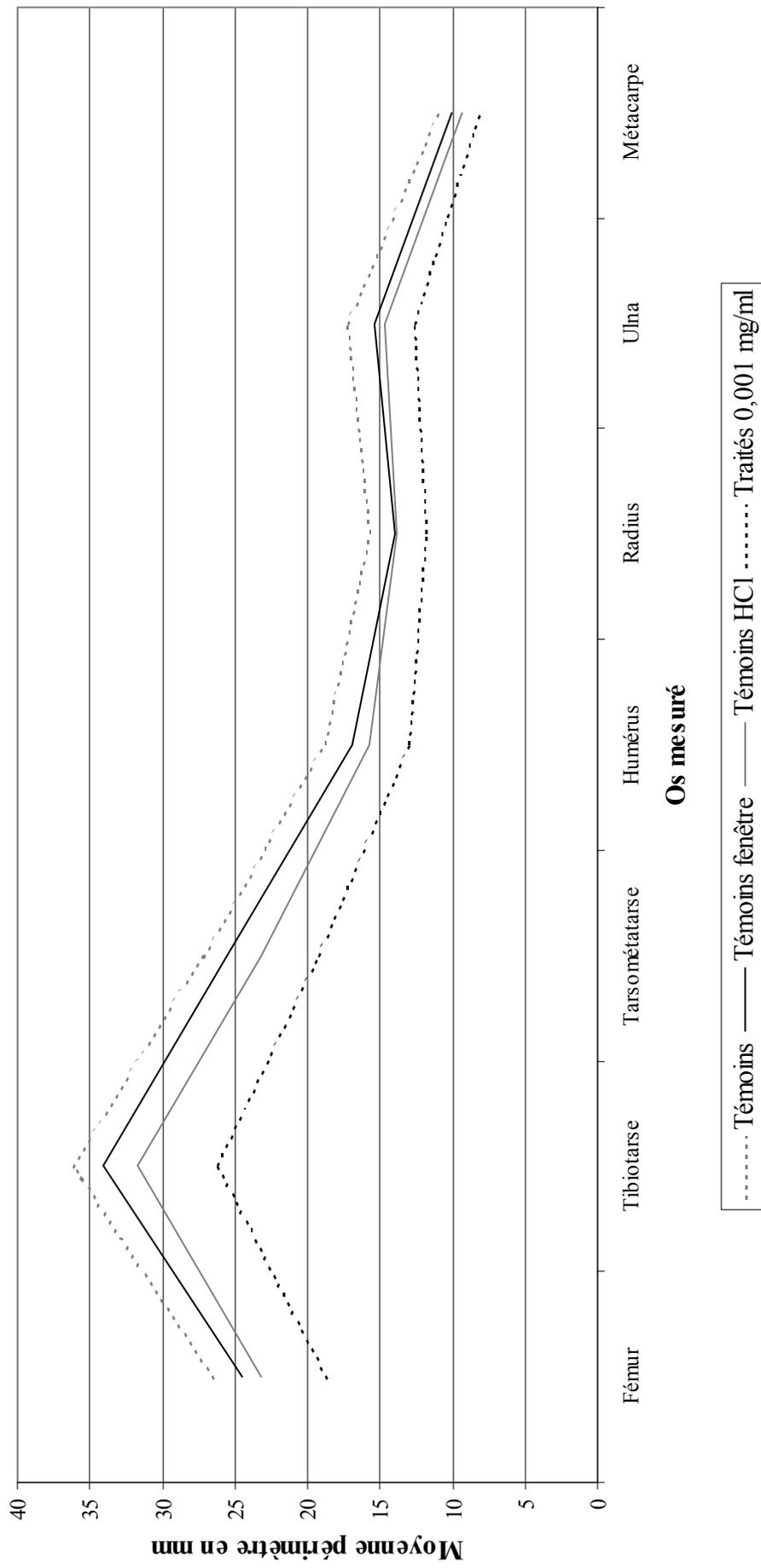
Pour chaque os, la valeur de la moyenne du grand diamètre dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités sont les plus petits.



Annexe D : Représentation graphique expérience n°1, périmètre.

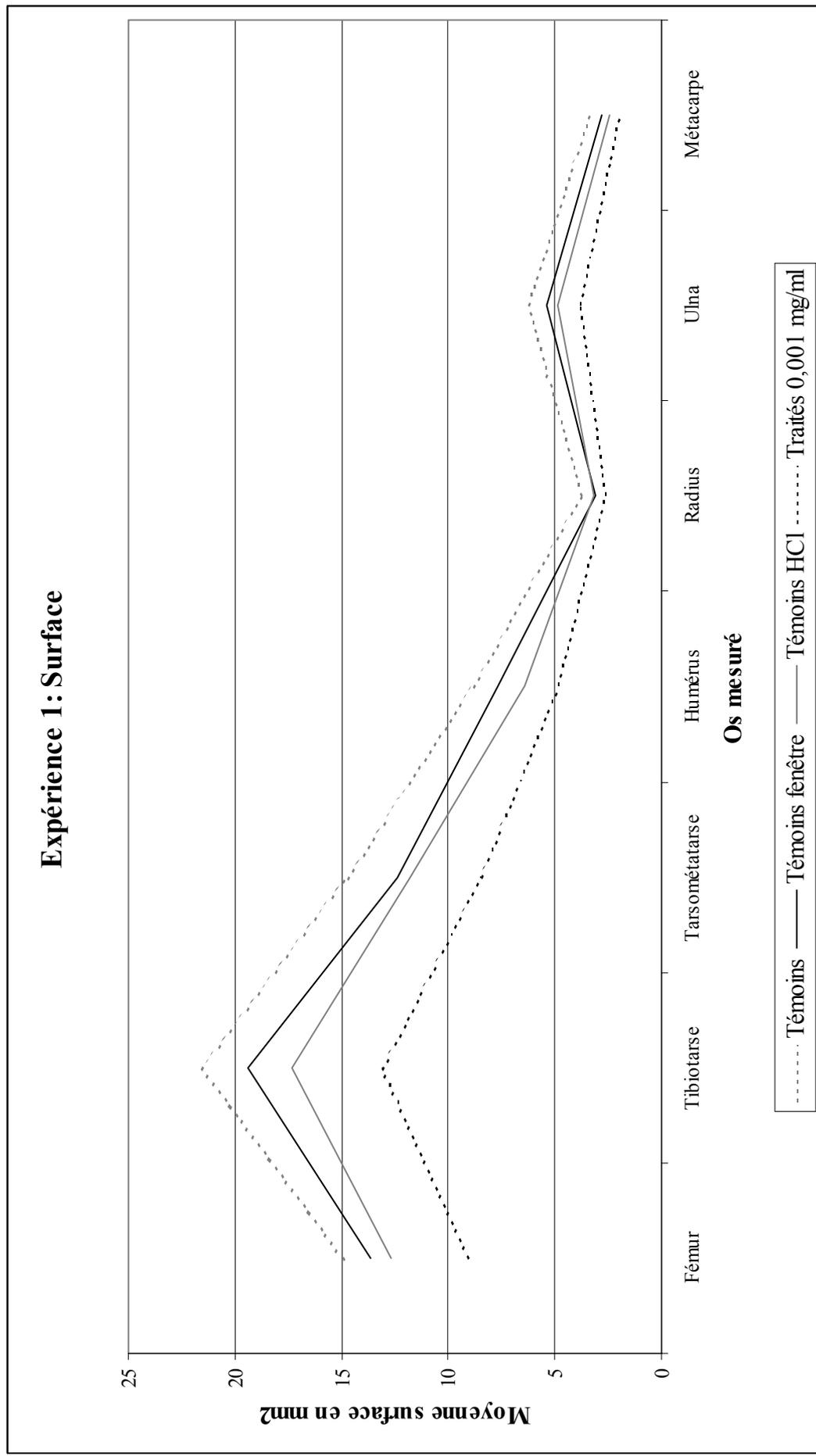
Pour chaque os, la valeur de la moyenne du périmètre dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités sont les plus petits.

Expérience 1: Périmètre



Annexe E : Représentation graphique expérience n°1, surface.

Pour chaque os, la valeur de la moyenne de la surface dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités sont les plus petits.



Annexe F : Tableau de données brutes pour l'expérience n°2.

Toutes les mesures sont exprimées en mm ou mm² pour les surfaces.

Remarque : lorsque les mesures ne sont pas inscrites dans le tableau, c'est que l'os considéré n'était pas exploitable d'un point de vue technique (fracture, os non mesurable car cassé lors du transport ou défaut de coloration...). Dans ce cas, les mesures n'entrent pas en compte dans l'analyse de la variance

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
1	Témoïn fenêtré	droite	Fémur	21,44	11,69	8,62
		gauche		21,47		8,62
		droite	Tibiotarse	27,54	16,32	11,08
		gauche		26,31		10,83
		droite	Tarsométatarse	21,89	12,62	8,59
		gauche		20,7		8,64
		droite	Humérus	14,86	5,48	6,13
		gauche		16,29		6,35
		droite	Radius	13,23	2,79	5,82
		gauche		14,14		5,94
		droite	Ulna	13,98	3,92	5,93
		gauche		14,66		5,94
		droite	Métacarpe	8,84	2,06	3,72
		gauche		8,86		3,76
2	Témoïn fenêtré	droite	Fémur	25,97	15,85	11,19
		gauche		24,96		10,84
		droite	Tibiotarse	34,06	21,23	15,16
		gauche		35,08		15,32
		droite	Tarsométatarse	25,89	14,18	11,23
		gauche		26,97		11,19
		droite	Humérus	16,76	7,19	7,32
		gauche		16,53		7,26
		droite	Radius	15,01	3,86	6,78
		gauche		15,05		6,76
		droite	Ulna	15,67	5,43	6,93
		gauche		16,01		6,95
		droite	Métacarpe	10,62	3	4,66
		gauche		10,53		4,62
3	Témoïn fenêtré	droite	Fémur	26,14	16,74	11,48
		gauche		26,12		11,48
		droite	Tibiotarse	36	24,22	16,06
		gauche		36,72		16,19
		droite	Tarsométatarse	28,34	19,9	11,35
		gauche		28,88		11,83
		droite	Humérus	17,74	7,99	7,53
		gauche		17,2		7,45
		droite	Radius	14,76	3,66	6,49
		gauche		14,54		6,46
		droite	Ulna	15,81	5,27	6,82
		gauche		15,89		6,92
		droite	Métacarpe	10,68	3,16	4,61
		gauche		10,5		4,62

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
4	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	25,09	15,71	10,98
		gauche		25,29	15,14	11,08
		droite	Tibiotarse	35,23	23,7	15,54
		gauche		35,72	24,65	15,71
		droite	Tarsométatarse	27,83	17,8	11,67
		gauche		27,71	17,97	11,58
		droite	Humérus	17,62	7,14	7,47
		gauche		17,61	7,92	7,43
		droite	Radius	15,18	3,88	6,8
		gauche		15,25	3,75	6,79
		droite	Ulna	16,23	6,15	7,16
		gauche		16,1	6,42	7,03
droite	Métacarpe	10,69	3,16	4,67		
gauche		10,68	3,06	4,63		
5	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	25,84	17	11,19
		gauche		26,69	17,13	11,43
		droite	Tibiotarse	35,83	24,6	15,72
		gauche		35,45	25,33	15,82
		droite	Tarsométatarse	27,91	18,26	11,62
		gauche		27,26	17,91	11,52
		droite	Humérus	17,95	7,3	7,48
		gauche		18,16	7,56	7,57
		droite	Radius	14,76	3,58	6,69
		gauche		15,18	3,84	6,83
		droite	Ulna	15,34	5,49	6,71
		gauche		16,04	5,72	6,99
droite	Métacarpe	10,89	3,24	4,78		
gauche		10,95	3,25	4,73		
6	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	22,58	12,9	9,74
		gauche		22,94	14,24	9,79
		droite	Tibiotarse	30,01	20,79	12,92
		gauche		28,9	19,11	12,66
		droite	Tarsométatarse	24,55	16,42	9,91
		gauche		23,28	12,75	10,04
		droite	Humérus	16,17	7,04	6,78
		gauche		16,24	7,6	6,62
		droite	Radius	13,77	3,18	6,18
		gauche		13,57	3,13	6,09
		droite	Ulna	14,76	5,11	6,46
		gauche		14,67	4,84	6,43
droite	Métacarpe	9,71	2,92	4,17		
gauche		9,66	2,52	4,2		
7	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	21,16	12,12	9,05
		gauche		20,81	11,27	9,15
		droite	Tibiotarse	27,96	15,75	12,37
		gauche		27,43	15,98	11,98
		droite	Tarsométatarse	21,03	10,22	9,17
		gauche		20,63	10,73	9,01
		droite	Humérus	13,73	4,42	5,71
		gauche		13,95	4,55	6,05
		droite	Radius	12,58	2,43	5,76
		gauche		13,2	2,87	5,87
		droite	Ulna	13,37	3,59	5,78
		gauche		13,08	3,66	5,66
droite	Métacarpe	9,08	2,15	3,98		
gauche		8,55	2,03	3,78		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
8	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	21,94	12,26	9,41
		gauche		21,41	11,8	9,34
		droite	Tibiotarse	29,68	17,13	13,2
		gauche		31,13	19,86	13,47
		droite	Tarsométatarse	23,39	12,13	9,66
		gauche		23,87	13,76	9,6
		droite	Humérus	15,03	6,21	6,42
		gauche		15,44	7,01	6,21
		droite	Radius	13,35	2,8	5,92
		gauche		12,62	2,8	5,74
		droite	Ulna	14,29	4,75	6,1
		gauche		13,8	5,56	6,01
droite	Métacarpe	9,8	2,65	4,27		
gauche		9,84	2,56	4,31		
9	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	25,81	16,44	11,19
		gauche		26,08	16,6	11,36
		droite	Tibiotarse	37,35	26,94	16,34
		gauche		37,24	27,16	16,32
		droite	Tarsométatarse	29,84	21,45	12
		gauche		28,67	20,29	12
		droite	Humérus	18,83	8,85	7,76
		gauche		18,94	8,46	7,61
		droite	Radius	15,71	4,4	6,95
		gauche		15,13	4,1	6,73
		droite	Ulna	16,87	6,23	7,21
		gauche		15,94	5,69	6,96
droite	Métacarpe	11,37	3,31	5,05		
gauche		10,71	3,33	4,68		
1	Témoïn HCl	droite	Fémur	23,73	13,97	10,22
		gauche		23,34	12,92	10,11
		droite	Tibiotarse	32,05	18,27	13,99
		gauche		30,77	18,68	13,6
		droite	Tarsométatarse	24,64	14,24	9,97
		gauche		22,56	11,76	10,03
		droite	Humérus	16,61	6,42	6,79
		gauche		16,52	5,88	6,84
		droite	Radius	14,41	3,96	6,34
		gauche		14	3,47	6,23
		droite	Ulna	14,8	5,11	6,48
		gauche		14,91	5,12	6,41
droite	Métacarpe	9,69	2,43	4,21		
gauche		9,35	2,5	3,99		
2	Témoïn HCl	droite	Fémur	27,26	17,87	11,83
		gauche		28,35	20,09	12,28
		droite	Tibiotarse	37,83	28,12	16,65
		gauche		37,53	27,37	16,91
		droite	Tarsométatarse	27,62	17,54	12,3
		gauche		29,66	20,48	12,35
		droite	Humérus	20,18	8,82	7,83
		gauche		19,49	8,37	8,08
		droite	Radius	15,53	4,58	6,94
		gauche		15,81	4,68	7,18
		droite	Ulna	16,89	6,8	7,11
		gauche		16,96	7,12	7,31
droite	Métacarpe	11,21	3,87	4,77		
gauche		11,29	3,94	4,77		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
3	Témoïn HCl	droite	Fémur	22,44	12,75	9,7
		gauche		23,06	12,84	10
		droite	Tibiotarse	30,2	18,38	13,55
		gauche		29,73	18,77	13,27
		droite	Tarsométatarse	23,45	12,85	10
		gauche		23,03	12,01	10,16
		droite	Humérus	16,13	6,15	6,63
		gauche		16,11	5,64	6,67
		droite	Radius	14	3,2	6,32
		gauche		13,78	3,27	6,22
		droite	Ulna	14,21	4,46	6,27
		gauche		14,62	4,92	6,34
droite	Métacarpe	9,59	2,52	4,19		
gauche		9,42	2,49	4,14		
4	Témoïn HCl	droite	Fémur	23,52	13,09	10,01
		gauche		22,8	12,92	9,75
		droite	Tibiotarse	31,38	18,16	14
		gauche		30,96	20,06	13,77
		droite	Tarsométatarse	22,87	14,04	9,91
		gauche		23,38	12,29	10,22
		droite	Humérus			
		gauche				
		droite	Radius			
		gauche				
		droite	Ulna			
		gauche				
droite	Métacarpe					
gauche						
1	Traité 0.1 mg/ml	droite	Fémur	27,8	16,76	11,99
		gauche		27,96	18,08	12,1
		droite	Tibiotarse	36,49	22,79	16,25
		gauche		37	25,05	16,39
		droite	Tarsométatarse	26,29	14,18	11,31
		gauche		25,71	15,36	11,19
		droite	Humérus	18,13	8,56	7,33
		gauche		19,28	8,29	7,66
		droite	Radius	15,29	4,09	6,95
		gauche		15,86	4,35	7,08
		droite	Ulna	16,62	6,42	7,14
		gauche		16,52	6,38	7,16
droite	Métacarpe	10,38	3,23	4,52		
gauche		10,47	3,05	4,6		
2	Traité 0.1 mg/ml	droite	Fémur	27,87	18,35	12,03
		gauche		28,05	18,54	11,93
		droite	Tibiotarse	37,36	26,1	16,59
		gauche		38,08	26,88	17,03
		droite	Tarsométatarse	28,49	17,8	12,15
		gauche		27,66	16,32	12,25
		droite	Humérus	18,47	8,9	7,88
		gauche		18,52	8,05	7,86
		droite	Radius	15,81	4,24	7,18
		gauche		15,86	4,36	7,01
		droite	Ulna	16,32	6,14	7,24
		gauche		16,74	6,42	7,35
droite	Métacarpe	10,62	3,16	4,51		
gauche		10,28	3,38	4,45		

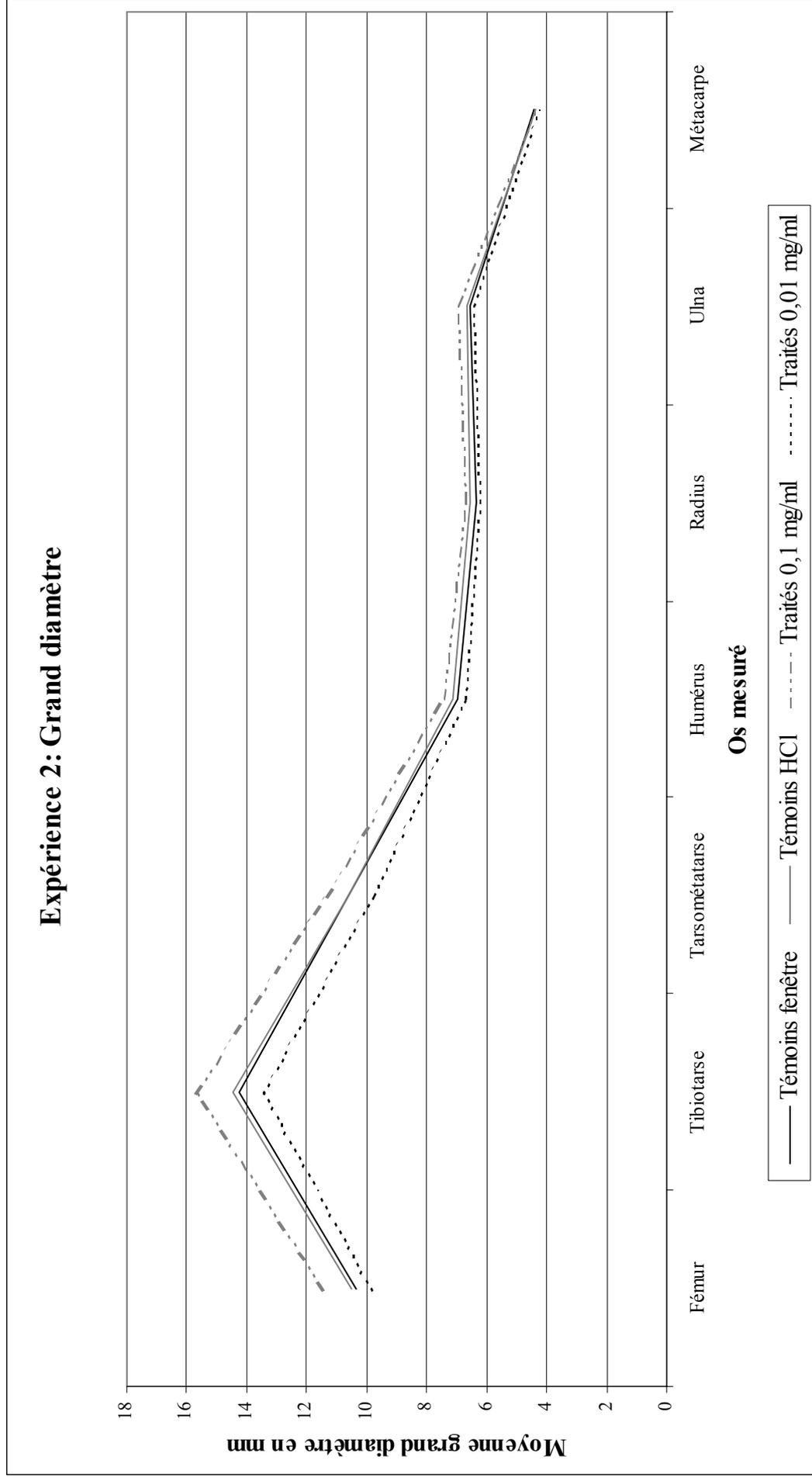
EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
3	Traité 0.1 mg/ml	droite	Fémur	23,99	13,66	10,3
		gauche		24,08	12,91	10,38
		droite	Tibiotarse	31,8	19,36	13,9
		gauche		32,2	19,65	14,11
		droite	Tarsométatarse	23,73	13,01	10,53
		gauche		25,02	16,04	10,52
		droite	Humérus	16,07	5,45	6,86
		gauche		17,07	5,99	6,92
		droite	Radius	13,53	2,79	6,06
		gauche		13,59	2,96	6,11
		droite	Ulna	14,53	4,49	6,42
		gauche		14,69	4,53	6,49
droite	Métacarpe	9	2,48	4,05		
gauche		9,42	2,25	4,1		
1	Traité 0.01 mg/ml	droite	Fémur	17,29	9,73	7,08
		gauche		17,34	9,96	7,22
		droite	Tibiotarse	22,6	14,16	9,88
		gauche		23,29	13,9	9,93
		droite	Tarsométatarse	16,29	8,38	7,09
		gauche		16,62	9,49	7,17
		droite	Humérus	12,74	4,7	5,3
		gauche		13,55	5,06	5,34
		droite	Radius	12,03	2,98	5,33
		gauche		12,03	2,71	5,37
		droite	Ulna	12,61	3,93	5,4
		gauche		12,51	3,91	5,43
droite	Métacarpe	8,78	2,33	3,88		
gauche		8,5	2,19	3,75		
2	Traité 0.01 mg/ml	droite	Fémur	26,84	18,52	11,25
		gauche		25,53	17,49	11,17
		droite	Tibiotarse	33,16	24,71	14,44
		gauche		33,39	24,77	14,49
		droite	Tarsométatarse	25,87	17,42	11,21
		gauche		25,99	17,1	11,31
		droite	Humérus	18,97	9,13	7,61
		gauche		18,85	8,74	7,6
		droite	Radius	15,53	4,34	6,93
		gauche		15,58	4,53	6,99
		droite	Ulna	16,65	6,45	7,06
		gauche		16,28	6,44	7,07
droite	Métacarpe	11,1	3,68	4,78		
gauche		11,12	3,53	4,79		
3	Traité 0.01 mg/ml	droite	Fémur	18,61	10,07	7,41
		gauche		18,44	9,25	7,41
		droite	Tibiotarse	24,15	13,53	10,27
		gauche		24,77	14,64	10,2
		droite	Tarsométatarse	17,12	8,8	7,18
		gauche		17,63	9,03	7,13
		droite	Humérus	12,33	4,32	5,14
		gauche				
		droite	Radius	11,33	2,27	5,1
		gauche				
		droite	Ulna	12,44	3,43	5,34
		gauche				
droite	Métacarpe					
gauche						

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
4	Traité 0.01 mg/ml	droite	Fémur	20,58	12,15	8,59
		gauche		20,68	12,29	8,58
		droite	Tibiotarse	26,68	15,07	11,43
		gauche		27,39	16,2	11,45
		droite	Tarsométatarse	18,98	10,28	8,23
		gauche		19,35	10,12	8,05
		droite	Humérus	13,82	4,95	5,88
		gauche		14,17	5,24	5,94
		droite	Radius	12,71	2,36	5,73
		gauche		12,41	2,49	5,62
		droite	Ulna	13,61	4,11	5,78
		gauche		13,67	4,22	5,84
droite	Métacarpe	9,07	2,3	3,96		
gauche		9,39	2,48	4,08		
5	Traité 0.01 mg/ml	droite	Fémur	27,16	17,45	11,69
		gauche		26,41	16,28	11,55
		droite	Tibiotarse	36,08	24,13	15,83
		gauche		35,27	23,79	15,87
		droite	Tarsométatarse	25,85	14,26	11,48
		gauche		26,07	13,26	11,54
		droite	Humérus	18,37	8,64	7,67
		gauche		18,29	8,81	7,57
		droite	Radius	15,33	3,85	6,89
		gauche		14,74	3,21	6,67
		droite	Ulna	15,98	5,78	6,98
		gauche		16,48	6,31	7,01
droite	Métacarpe	10,25	2,81	4,48		
gauche		10,29	3,16	4,49		
6	Traité 0.01 mg/ml	droite	Fémur	27,92	18,37	12,21
		gauche		27,02	17,57	11,79
		droite	Tibiotarse	37,15	25,18	16,85
		gauche		37,65	25,04	16,83
		droite	Tarsométatarse	29,66	18,94	12,44
		gauche		28,15	16,26	12,3
		droite	Humérus	18,62	10,4	7,58
		gauche		18,59	8,41	7,77
		droite	Radius	16,1	4,62	7,13
		gauche		15,93	4,39	7,09
		droite	Ulna	16,69	6,26	7,3
		gauche		16,65	6,97	7,23
droite	Métacarpe	10,54	3,12	4,64		
gauche		11,43	3,69	4,84		
7	Traité 0.01 mg/ml	droite	Fémur	21	10,5	9,16
		gauche		20,83	10,93	9,11
		droite	Tibiotarse	29,01	17,24	12,83
		gauche		29	15,54	13,14
		droite	Tarsométatarse	21,43	13,6	9,33
		gauche		20,95	8,91	9,28
		droite	Humérus	15,1	7	6,17
		gauche		15,42	5,83	6,32
		droite	Radius	12,85	3,01	5,85
		gauche		13,21	3,24	5,88
		droite	Ulna	14,05	4,41	6,13
		gauche		13,71	4,48	6,07
droite	Métacarpe	8,62	2,21	3,8		
gauche		8,89	2,3	3,74		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
8	Traité 0.01 mg/ml	droite	Fémur	26,99	15,63	11,55
		gauche		26,42	15,85	11,51
		droite	Tibiotarse	36,56	25,07	16,08
		gauche		35,7	22,9	16,09
		droite	Tarsométatarse	28,06	20,09	11,38
		gauche		27,56	20,25	11,13
		droite	Humérus	18	8,48	7,27
		gauche		17,69	7,34	7,25
		droite	Radius	14,91	4,12	6,71
		gauche		14,79	3,72	6,66
		droite	Ulna	15,8	5,45	6,87
		gauche		16,21	5,88	7,1
		droite	Métacarpe	9,78	2,71	4,35
		gauche		10,55	3,28	4,44

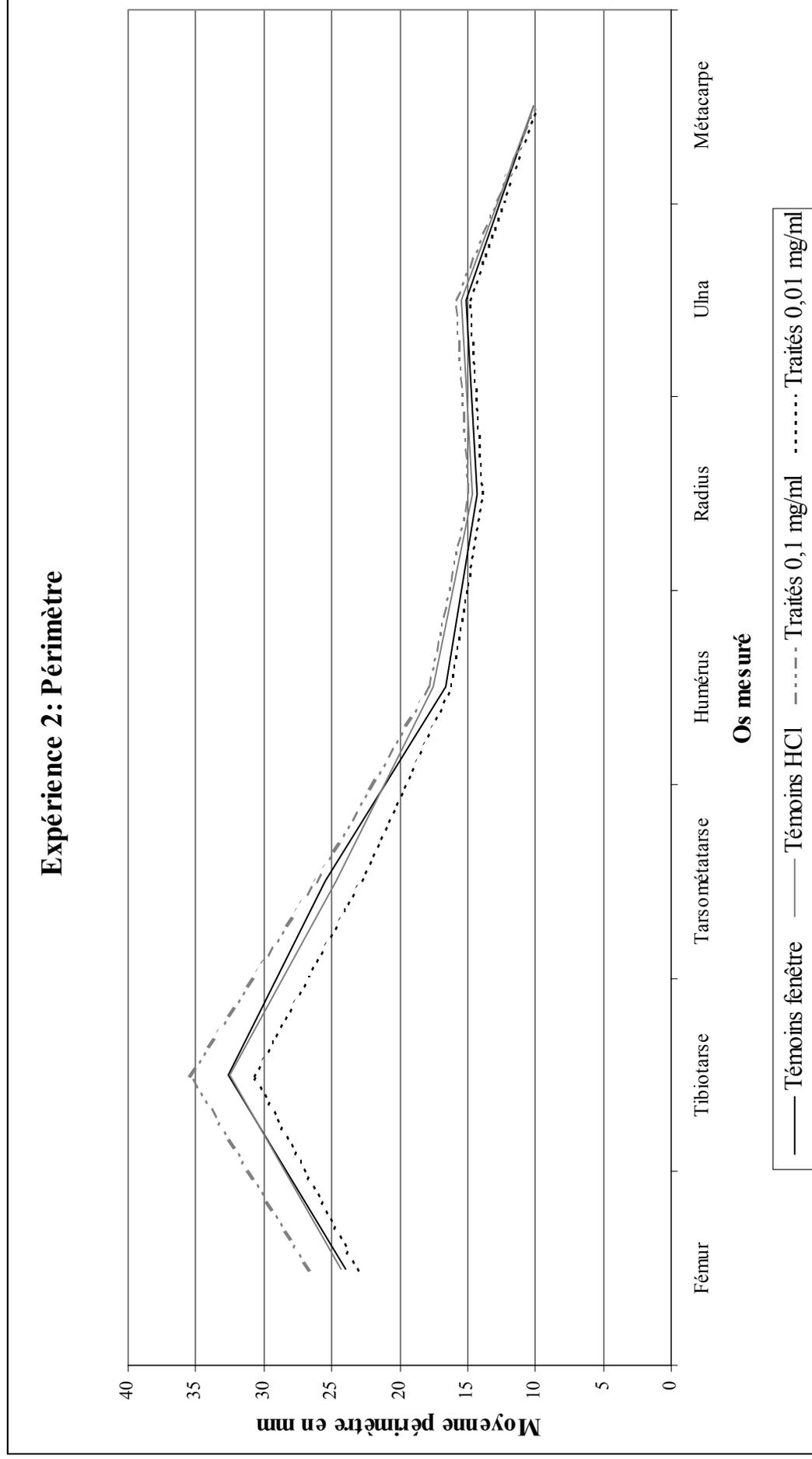
Annexe G : Représentation graphique expérience n°2, grand diamètre.

Pour chaque os, la valeur de la moyenne du grand diamètre dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités à 0.01 mg/ml sont les plus petits.



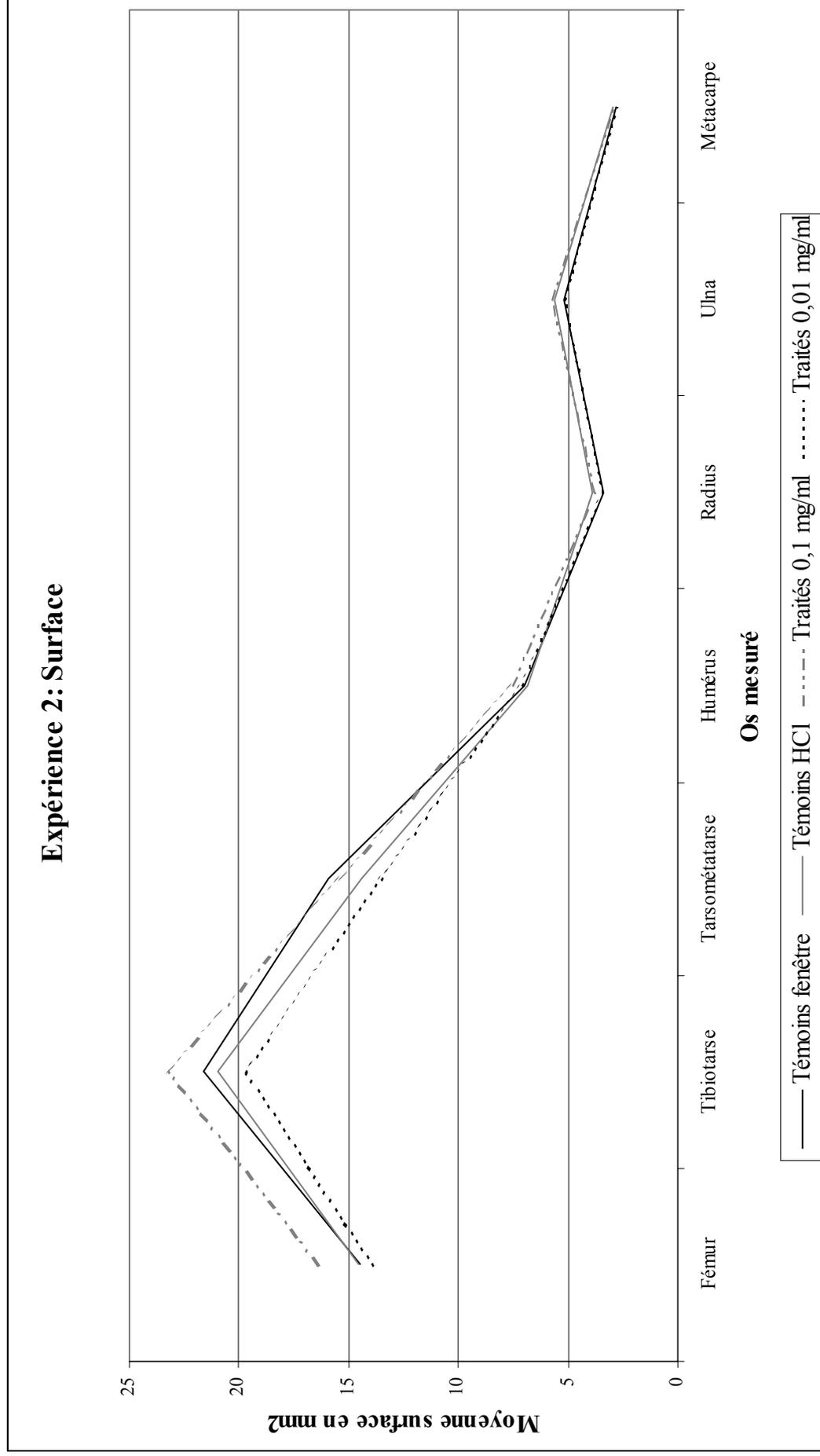
Annexe H : Représentation graphique expérience n°2, périmètre.

Pour chaque os, la valeur de la moyenne du périmètre dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités à 0.01 mg/ml sont les plus petits.



Annexe I : Représentation graphique expérience n°2, surface.

Pour chaque os, la valeur de la moyenne de la surface dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités à 0.01 mg/ml sont les plus petits.



Annexe J : Tableau de données brutes pour l'expérience n°3.

Toutes les mesures sont exprimées en mm ou mm² pour les surfaces.

Remarque : lorsque les mesures ne sont pas inscrites dans le tableau, c'est que l'os considéré n'était pas exploitable d'un point de vue technique (fracture, os non mesurable car cassé lors du transport ou défaut de coloration...). Dans ce cas, les mesures n'entrent pas en compte dans l'analyse de la variance.

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
1	Témoin fenêtre	droite	Fémur	21,26	11,84	9,12
		gauche		22,28	12,43	9,4
		droite	Tibiotarse	28,27	16,99	12,72
		gauche		29,43	18,22	12,89
		droite	Tarsométatarse	21,62	11,88	9,06
		gauche		21,21	9,96	9,33
		droite	Humérus	15,67	5,74	6,26
		gauche		15,86	5,87	6,3
		droite	Radius	13,07	3,22	5,84
		gauche		13,14	3,04	5,93
		droite	Ulna	13,88	4,82	5,94
		gauche		14,03	4,6	6,05
		droite	Métacarpe	9,31	2,29	4,02
		gauche		9,79	2,81	4,21
2	Témoin fenêtre	droite	Fémur	20,12	11,18	8,48
		gauche		19,47	11,18	8,28
		droite	Tibiotarse	25,09	15,65	10,8
		gauche		24,84	15,25	10,55
		droite	Tarsométatarse	18,2	7,51	7,95
		gauche		18,43	9,34	7,95
		droite	Humérus	14,98	4,89	6,02
		gauche		15,28	5,21	6,09
		droite	Radius	12,46	2,57	5,56
		gauche		12,57	2,49	5,65
		droite	Ulna	13,4	4,16	5,86
		gauche		13,27	3,93	5,65
		droite	Métacarpe	9,2	2,39	3,99
		gauche		8,49	2,28	3,68
3	Témoin fenêtre	droite	Fémur	20,97	12,7	8,61
		gauche		20,92	12,71	8,55
		droite	Tibiotarse	25,33	15,68	10,56
		gauche		25,72	15,98	10,66
		droite	Tarsométatarse	19,69	10,77	8,54
		gauche		19,59	10,39	8,34
		droite	Humérus	15,58	6,37	6,27
		gauche		15,57	6,14	6,38
		droite	Radius	13,79	3,44	6,15
		gauche		13,92	3,19	6,26
		droite	Ulna	14,63	5	6,21
		gauche		14,01	4,69	6,18
		droite	Métacarpe	9,14	2,41	3,98
		gauche		9,53	2,42	4,06

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
4	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	21,16	11,86	8,98
		gauche		21,83	12,1	9,28
		droite	Tibiotarse	28,53	17,33	12,43
		gauche		27,96	17,2	12,24
		droite	Tarsométatarse	21,25	13,5	9,04
		gauche		22,78	14,61	9,08
		droite	Humérus	14,54	5,39	6,09
		gauche		14,78	5,39	6,15
		droite	Radius	12,93	2,88	5,9
		gauche		12,92	3,07	5,94
		droite	Ulna	13,8	4,51	5,93
		gauche		14,17	5,32	6,21
		droite	Métacarpe	9,28	2,37	4,02
		gauche		9,2	2,68	3,96
5	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	21,75	12,35	9,24
		gauche		21,67	13,33	9,24
		droite	Tibiotarse	27,93	17,51	12,16
		gauche		28,95	18,86	12,29
		droite	Tarsométatarse	20,96	12,23	8,82
		gauche		21,52	13,09	8,85
		droite	Humérus	15,53	5,66	6,34
		gauche		14,38	4,58	6,22
		droite	Radius	12,89	2,79	5,76
		gauche		13,01	3,02	5,79
		droite	Ulna	14,02	4,53	6,13
		gauche		14,05	4,23	6,09
		droite	Métacarpe	9,5	2,33	4,07
		gauche		9,65	2,59	4,22
6	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	18,47	9,57	7,91
		gauche		18,63	9,88	8,03
		droite	Tibiotarse	22,62	12,93	9,91
		gauche		23,65	14,77	10,19
		droite	Tarsométatarse	17,97	8,33	7,88
		gauche		17,72	8,07	7,69
		droite	Humérus	13,04	4,58	5,53
		gauche		12,99	4,26	5,31
		droite	Radius	11,52	2,58	5,07
		gauche				
		droite	Ulna	11,74	3,26	4,99
		gauche		11,83	3,23	5,25
		droite	Métacarpe	7,5	1,69	3,37
		gauche		8,34	2,09	3,6
7	Témoïn fenêtre	droite	Fémur	23,06	13,31	9,81
		gauche		23,84	12,99	10,27
		droite	Tibiotarse	31,58	20,16	13,43
		gauche		31,72	19,72	13,63
		droite	Tarsométatarse	24,42	15,12	9,81
		gauche		23,51	14,75	9,98
		droite	Humérus	15,86	5,45	6,78
		gauche		15,78	6,03	6,34
		droite	Radius	13,35	2,79	6,03
		gauche		12,41	2,66	5,68
		droite	Ulna	14,53	5	6,41
		gauche		14,21	4,95	6,03
		droite	Métacarpe	9,55	2,27	4,2
		gauche		9,52	2,53	4,2

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
1	Témoins HCl	droite	Fémur	17,07	8,65	6,81
		gauche		17,22	8,89	6,9
		droite	Tibiotarse	22,21	11,93	9,17
		gauche		21,17	11,17	8,97
		droite	Tarsométatarse	15,49	7,96	6,54
		gauche		15,26	6,19	6,43
		droite	Humérus	13,4	5,13	5,37
		gauche		13,35	4,77	5,25
		droite	Radius	11,35	2,31	5,02
		gauche		11,25	2,34	4,96
		droite	Ulna	11,54	3,06	5,04
		gauche		11,75	3,56	5,11
		droite	Métacarpe	8,05	1,8	3,42
		gauche		7,69	1,89	3,26
2	Témoins HCl	droite	Fémur	21,29	13,87	8,91
		gauche		20,76	13,02	8,79
		droite	Tibiotarse	27,22	18,75	11,44
		gauche		27,35	17,85	11,49
		droite	Tarsométatarse	20,53	12,32	8,66
		gauche		20,14	11,04	8,49
		droite	Humérus	16,75	7,5	6,41
		gauche		15,48	6,33	6,35
		droite	Radius	13,47	3,31	6,06
		gauche		13,35	3,32	5,83
		droite	Ulna	14,3	4,63	6,04
		gauche		14,16	4,87	5,96
		droite	Métacarpe	9,52	2,58	4,05
		gauche		9,61	2,57	4,03
3	Témoins HCl	droite	Fémur	20,29	10,41	8,59
		gauche		20,45	11,73	8,64
		droite	Tibiotarse	26,23	14,39	11,67
		gauche		26,87	15,1	11,72
		droite	Tarsométatarse	18,04	8,79	7,91
		gauche		18,29	7,02	8,01
		droite	Humérus	12,91	4,58	5,52
		gauche		13,36	4,76	5,61
		droite	Radius	11,61	2,4	5,19
		gauche		11,4	2,38	5,03
		droite	Ulna	12,2	3,51	5,4
		gauche		11,7	3,36	5,09
		droite	Métacarpe	8,08	1,88	3,55
		gauche		8,02	1,74	3,43
4	Témoins HCl	droite	Fémur	25,4	13,55	10,75
		gauche		24,42	15,02	10,73
		droite	Tibiotarse	32,77	19,88	14,87
		gauche		33,09	21,21	14,98
		droite	Tarsométatarse	25,3	15,1	10,51
		gauche		24,15	11,55	10,63
		droite	Humérus	17,24	7,2	7,05
		gauche		17,37	7,09	7,14
		droite	Radius	14,59	3,55	6,5
		gauche		14,18	3,12	6,3
		droite	Ulna	15,52	5,28	6,68
		gauche		15,68	5,4	6,64
		droite	Métacarpe	10,24	2,6	4,2
		gauche		9,88	2,72	4,25

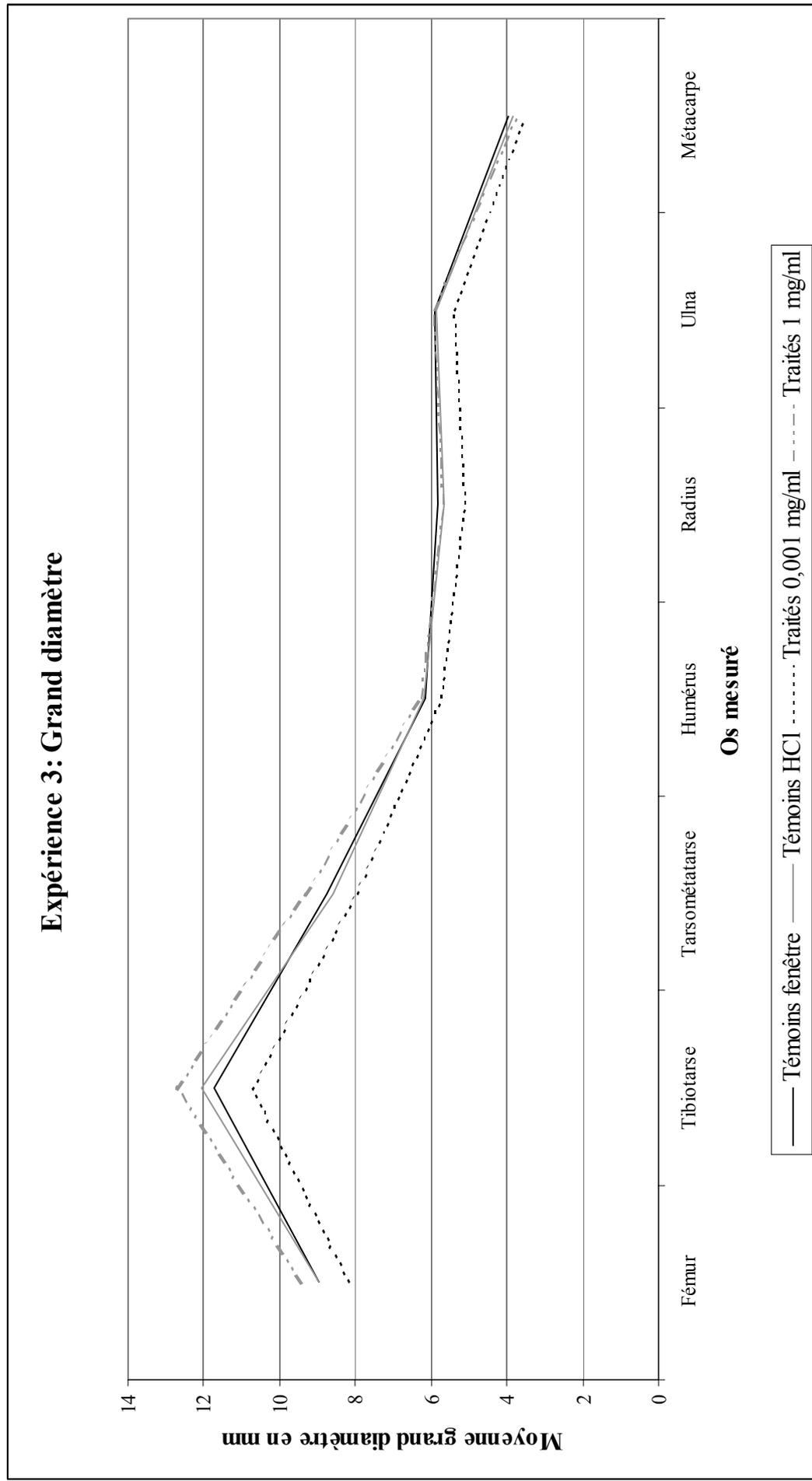
EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
5	Témoin HCl	droite	Fémur	22,89	14,05	9,78
		gauche		22,72	14,16	9,74
		droite	Tibiotarse	29,78	17,87	13,12
		gauche		30,67	19,88	13,34
		droite	Tarsométatarse	21,61	12,3	9,26
		gauche		21,74	12,35	9,3
		droite	Humérus	16,15	6,97	6,46
		gauche		16,39	6,87	6,64
		droite	Radius	12,73	2,85	5,79
		gauche		14,02	2,99	6,08
		droite	Ulna	14,15	4,25	6,16
		gauche		14,65	4,99	6,36
droite	Métacarpe	9,64	2,75	4,14		
gauche		9,84	2,64	4,22		
1	Traité 1 mg/ml	droite	Fémur	18,71	8,4	7,98
		gauche		18,77	8,66	7,71
		droite	Tibiotarse	23,73	12,1	10,35
		gauche		23,89	12,28	10,22
		droite	Tarsométatarse	15,5	6,2	6,89
		gauche		16,96	7,83	7,19
		droite	Humérus	13,7	3,43	5,77
		gauche		13,01	3,52	5,62
		droite	Radius	10,78	1,49	4,79
		gauche		10,54	1,78	4,7
		droite	Ulna	11,73	2,5	5,16
		gauche		12,09	3,16	5,24
droite	Métacarpe	7,49	1,34	3,17		
gauche		7,23	1,45	3,06		
2	Traité 1 mg/ml	droite	Fémur	20,86	11,06	8,74
		gauche		21,17	11,61	9,01
		droite	Tibiotarse	26,65	14,62	11,72
		gauche		27,92	15,12	11,89
		droite	Tarsométatarse	19,52	9,99	8,5
		gauche		19,99	9,39	8,68
		droite	Humérus	12,98	4,54	5,42
		gauche		14,01	4,51	5,83
		droite	Radius	11,61	2,31	5,2
		gauche		11,95	2,11	5,25
		droite	Ulna	12,74	3,68	5,46
		gauche		13,18	3,78	5,58
droite	Métacarpe	7,78	1,76	3,29		
gauche		7,86	1,72	3,35		
3	Traité 1 mg/ml	droite	Fémur	18,23	8,08	7,76
		gauche		17,78	8,69	7,7
		droite	Tibiotarse	23,32	12,16	9,98
		gauche		22,54	11,78	9,52
		droite	Tarsométatarse	17,52	8,19	7,52
		gauche		16,91	8,39	7,26
		droite	Humérus	12,18	3,42	5,06
		gauche		12,66	3,82	5,19
		droite	Radius	10,95	2,07	4,85
		gauche		10,84	2,1	4,85
		droite	Ulna	11,75	3,01	5,02
		gauche		11,53	3,01	5,03
droite	Métacarpe	7,47	1,63	3,18		
gauche		7,12	1,58	3,14		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
4	Traité 1 mg/ml	droite	Fémur	24,84	13,59	10,63
		gauche		24,85	14,91	10,64
		droite	Tibiotarse	32,46	21,02	14,31
		gauche		32,86	19,8	14,41
		droite	Tarsométatarse	24,35	14,49	10,46
		gauche		24,83	14,1	10,66
		droite	Humérus	16,91	6,71	6,87
		gauche		16,59	6,42	6,96
		droite	Radius	13,97	2,93	6,31
		gauche		14,11	2,95	6,35
		droite	Ulna	14,53	4,61	6,33
		gauche		14,89	4,78	6,49
droite	Métacarpe	9,44	2,39	4,15		
gauche		10,08	2,61	4,43		
5	Traité 1 mg/ml	droite	Fémur	24,69	13,91	11,02
		gauche		24,06	13,78	10,41
		droite	Tibiotarse	33,87	21,83	14,98
		gauche		34,51	22,78	15,13
		droite	Tarsométatarse	26,51	15,95	11,22
		gauche		26,04	15,74	11,13
		droite	Humérus	17,46	6,72	7,23
		gauche		17,2	7,09	7,45
		droite	Radius	14,08	3,18	6,43
		gauche		14,45	3,53	6,67
		droite	Ulna	15,67	5,66	6,66
		gauche		15,68	5,82	6,81
droite	Métacarpe	9,96	2,83	4,28		
gauche		10,31	3,11	4,44		
6	Traité 1 mg/ml	droite	Fémur	24,88	16,69	10,71
		gauche		25,57	15,88	10,82
		droite	Tibiotarse	33,4	24,06	15,01
		gauche		33,29	24,4	14,88
		droite	Tarsométatarse	26,51	17,23	11,19
		gauche		26,72	18,43	11,18
		droite	Humérus	16,82	6,63	6,82
		gauche		17,24	6,76	7,03
		droite	Radius	14,47	3,34	6,53
		gauche		14,42	3,43	6,54
		droite	Ulna	15,29	5,14	6,73
		gauche		15,28	5,8	6,76
droite	Métacarpe	10,12	2,86	4,37		
gauche		10,1	2,86	4,39		
1	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	14,9	7,33	5,92
		gauche		15,15	7,82	6,07
		droite	Tibiotarse	17,45	10,09	6,74
		gauche		17,03	9,46	6,41
		droite	Tarsométatarse	13,48	5,51	5,59
		gauche		14,6	6,99	6,12
		droite	Humérus	11,99	4,02	5,15
		gauche		11,6	3,67	4,86
		droite	Radius	9,68	1,82	4,31
		gauche		9,96	2,14	4,25
		droite	Ulna	10,23	2,56	4,37
		gauche		10,29	3	4,34
droite	Métacarpe	7,03	1,96	2,92		
gauche		6,77	1,97	2,81		

EMBRYON	TRAITEMENT	LATERALE	OS	PERIMETRE	SURFACE	GRAND DIAMETRE
2	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	20,33	11,31	8,57
		gauche		19,93	10,2	8,43
		droite	Tibiotarse	26,27	13,75	11,49
		gauche		26,08	13,66	11,48
		droite	Tarsométatarse	19,56	11,42	8,55
		gauche		19,62	11,68	8,24
		droite	Humérus	13,3	4,22	5,76
		gauche		14,07	4,98	5,72
		droite	Radius	11,97	2,3	5,37
		gauche		11,66	2,55	5,21
		droite	Ulna	12,96	3,58	5,79
		gauche		12,97	3,69	5,56
		droite	Métacarpe	8,49	2,1	3,76
		gauche		8,03	2,14	3,38
3	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	20,99	11,72	8,77
		gauche		20,84	11,83	8,69
		droite	Tibiotarse	27,43	17,06	11,98
		gauche		28,25	16,88	12,45
		droite	Tarsométatarse	20,33	12,96	8,33
		gauche		19,83	10,38	8,62
		droite	Humérus	13,84	5,7	5,88
		gauche		14,79	5,08	6,11
		droite	Radius	11,66	2,66	5,23
		gauche		12,33	2,72	5,43
		droite	Ulna	12,8	3,54	5,54
		gauche				
		droite	Métacarpe	8,42	2,11	3,68
		gauche		8,96	2,47	3,89
4	Traité 0.001 mg/ml	droite	Fémur	22,46	12,92	9,36
		gauche		22,79	13,13	9,65
		droite	Tibiotarse	28,62	16,42	12,41
		gauche		29,86	17,21	12,94
		droite	Tarsométatarse	20,34	9,03	8,9
		gauche		21,13	9,74	9,43
		droite	Humérus	14,88	5,13	6,28
		gauche		14,43	4,55	6,01
		droite	Radius	12,55	2,71	5,57
		gauche		13,12	2,61	5,74
		droite	Ulna	14,19	4,45	6,1
		gauche		14,31	4,26	6,09
		droite	Métacarpe	9,34	2,39	3,99
		gauche		9,27	2,35	4,09

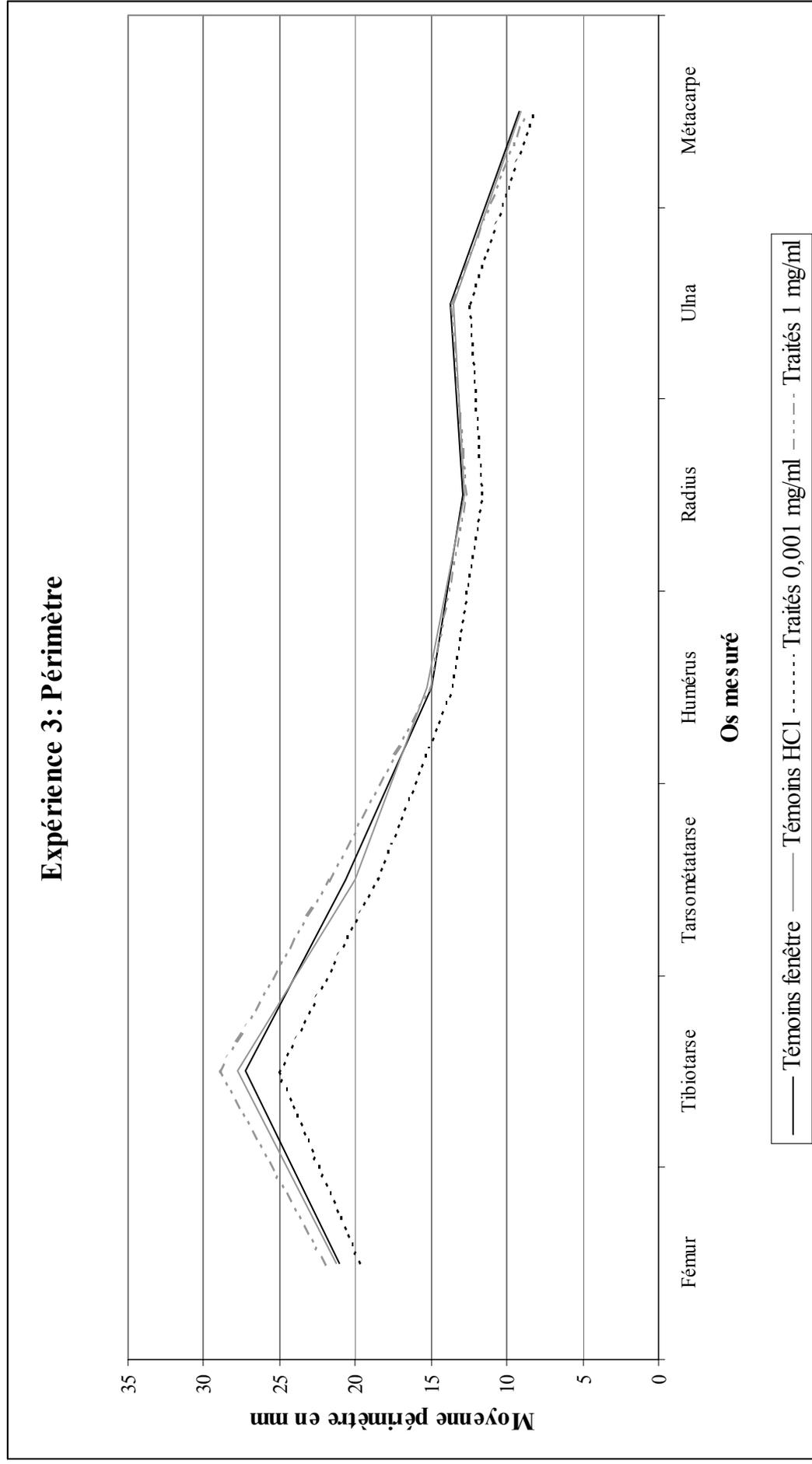
Annexe K : Représentation graphique expérience n°3, grand diamètre.

Pour chaque os, la valeur de la moyenne du grand diamètre dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités à 0.001 mg/ml sont les plus petits.



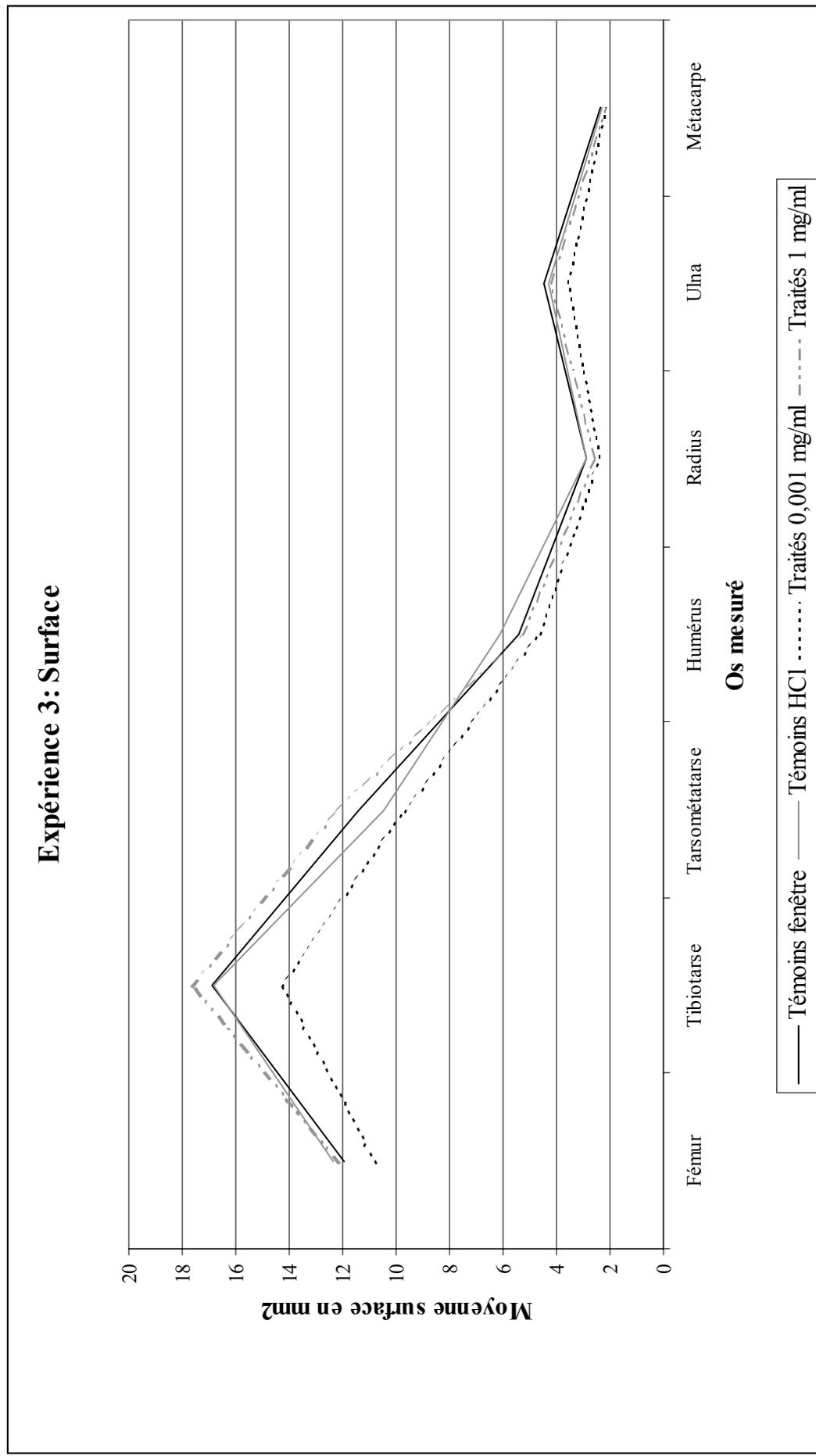
Annexe L : Représentation graphique expérience n°3, périmètre.

Pour chaque os, la valeur de la moyenne du périmètre dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités à 0.001 mg/ml sont les plus petits.



Annexe M : Représentation graphique expérience n°3, surface.

Pour chaque os, la valeur de la moyenne de la surface dans chaque échantillon (témoins et traités) est représentée. On voit que, pour chaque os, les traités à 0.001 mg/ml sont les plus petits.



Toulouse, 2002

NOM : GRAILLE

PRENOM : SANDRINE

TITRE : EFFETS DU SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE SUR L'ORGANOGENESE DU SQUELETTE APPENDICULAIRE DE L'EMBRYON DE POULET. ETUDE PAR ANALYSEUR D'IMAGES.

RESUME : L'AUTEUR ETUDIE LES EFFETS DU SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE SUR L'ORGANOGENESE DU SQUELETTE APPENDICULAIRE DE L'EMBRYON DE POULET. IL PRESENTE LES RESULTATS D'UNE ETUDE EXPERIMENTALE APRES UNE SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT QUELQUES BENZIMIDAZOLES, LA LEGISLATION DE L'EMBRYOTOXICITE, L'EMBRYON DE POULET COMME MODELE EXPERIMENTAL ET LA MORPHOMETRIE.

UNE ETUDE MORPHOMETRIQUE A L'AIDE D'UN ANALYSEUR INFORMATIQUE D'IMAGES EST REALISEE SUR LES SIX OS DU SQUELETTE APPENDICULAIRE DE FŒTUS DE POULET A 15.5 JOURS D'INCUBATION. L'AUTEUR CHERCHE SI LES MESURES DES OS SONT DIFFERENTES ENTRE DES POPULATIONS EMBRYONNAIRES TEMOINS (TEMOINS « PURS », TEMOINS AVEC UN TROU DANS LA COQUILLE, TEMOINS « SOLVANT ») ET UNE POPULATION EMBRYONNAIRE EXPOSEE AU SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE DES LA CINQUANTE QUATRIEME HEURE D'INCUBATION.

LES RESULTATS DES ANALYSES DE LA VARIANCE NE MONTRENT PAS DE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE DANS LA MESURE DES OS DES POPULATIONS EMBRYONNAIRES ETUDIEES. CEPENDANT IL APPARAIT SYSTEMATIQUEMENT UNE DIFFERENCE SIGNIFICATIVE ENTRE LES TEMOINS « PURS » ET LES EMBRYONS EXPOSES AU SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE. CETTE DIFFERENCE SEMBLE RESULTER DE DIVERS FACTEURS : LE FAIT DE TROUER LA COQUILLE, D'INJECTER DU SOLVANT ET DU SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE. POUR METTRE EN EVIDENCE L'EFFET DU SEUL SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE SUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE, D'AUTRES ETUDES SERONT NECESSAIRES. L'AUTEUR ENVISAGE DANS SA DISCUSSION UN NOUVEAU PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR MIEUX CERNER LES EFFETS DU SULFOXYDE D'ALBENDAZOLE.

MOTS-CLES : BENZIMIDAZOLES - ALBENDAZOLE - NETOBIMIN - EMBRYON DE POULET - EMBRYOGENESE - DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE - TERATOLOGIE - TOXICITE - LEGISLATION - MEDICAMENT - MORPHOMETRIE.

OK

ENGLISH TITLE : EFFECTS OF ALBENDAZOLE SULPHOXYDE ON THE DEVELOPMENT OF CHICKEN EMBRYO LIMBS. STUDY BY COMPUTER ANALYSER.

ABSTRACT : THE AUTHOR STUDIES THE EFFECTS OF ALBENDAZOLE SULPHOXYDE ON THE DEVELOPMENT OF CHICKEN EMBRYO SKELETONS. THE RESULTS OF AN EXPERIMENTAL BIBLIOGRAPHICAL SYNTHESIS STUDY CONCERNING SOME BENZIMIDAZOLES, THE LEGISLATION OF THE EMBRYOTOXICITY, THE EMBRYO OF CHICKEN AS AN EXPERIMENTAL MODEL AND MORPHOMETRIC STUDIES ARE PRESENTED.

A COMPUTER ANALYSED MORPHOMETRIC STUDY OF IMAGES IS CARRIED OUT ON THE SIX BONES OF THE LIMBS SKELETON OF A CHICKEN FŒTUS AFTER 15.5 DAYS OF INCUBATION. THE AUTHOR EXAMINES IF THE MEASURES OF BONES ARE DIFFERENT BETWEEN THE EMBRYONIC POPULATION CONTROLS (« PURE » CONTROLS, CONTROLS WITH A HOLE IN THE SHELL, « SOLVENT » CONTROLS) AND AN EMBRYONIC POPULATION EXPOSED TO ALBENDAZOLE SULPHOXYDE FROM THE 54-TH HOUR OF INCUBATION.

THE RESULTS OF THE ANALYSIS OF THE VARIANCE DO NOT SHOW SIGNIFICANT DIFFERENCE AS FAR AS THE BONES OF THE STUDIED EMBRYONIC POPULATIONS. HOWEVER A SIGNIFICANT DIFFERENCE APPEARS SYSTEMATICALLY BETWEEN « PURE » EMBRYO CONTROLS AND EMBRYOS EXPOSED TO THE ALBENDAZOLE SULPHOXYDE.

THIS DIFFERENCE SEEMS TO BE THE RESULT OF DIFFERENT FACTORS : THE PIERCING OF THE SHELL, THE INJECTION OF THE SOLVENT AND THE ALBENDAZOLE SULPHOXYDE. TO ILLUSTRATE THE EFFECT OF ONLY THE ALBENDAZOLE SULPHOXYDE ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT, OTHERS STUDIES WILL BE NECESSARY. THE AUTHOR ENVISAGES IN HER DISCUSSION A NEW EXPERIMENTAL PROTOCOL TO UNDERSTAND BETTER THE EFFECTS OF THE ALBENDAZOLE SULPHOXYDE.

KEY WORDS : BENZIMIDAZOLES - ALBENDAZOLE - NETOBIMIN - CHICKEN EMBRYO-EMBRYOGENESIS - EMBRYONIC DEVELOPMENT - TERATOLOGY - TOXICITY - LEGISLATION - DRUGS - MORPHOMETRY.