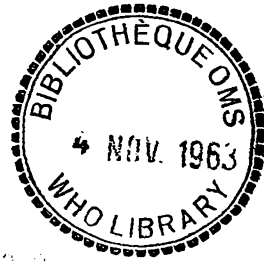


a 63369



WHO/Mal/398
6 juin 1963

ORIGINAL : ANGLAIS

ETUDE SUR L'ACTION COMBINEE DE LA DIAMINO-DIPHENYL SULFONE (DDS)
ET DE LA PYRIMETHAMINE CONTRE PLASMODIUM GALLINACEUM ET
PLASMODIUM CYNOMOLGI BASTIANELLII;
EFFET DE POTENTIALISATION ENTRE LES DEUX PRODUITS¹

par

P. C. Basu, N. N. Singh et Naunihal Singh
Central Institute for Communicable Diseases,
Delhi, Inde²

A mesure que se développe la chimiothérapie des maladies infectieuses, les cas de résistance aux médicaments sont de plus en plus nombreux. Pour faire face à ce problème, on a pensé qu'il serait bon non seulement de chercher à mettre au point de nouveaux produits, mais aussi d'examiner si les produits existants ne sont pas capables de potentialisation réciproque.

Rollo (1955) et Hurly (1959) ont signalé que la pyriméthamine est potentialisée par la sulfadiazine, le premier dans le cas du paludisme aviaire et le second dans celui du paludisme humain.

On a constaté d'autre part que la DDS (diamino-diphényl sulfone) est un schizontocide faible à l'égard de P. gallinaceum et qu'elle est moins active que la sulfadiazine contre P. cynomolgi. Il semble en revanche qu'elle est supérieure à la sulfadiazine pour le traitement des infections à P. knowlesi et du paludisme humain à P. falciparum (Archibald & Ross, 1960; Ramakrishnan et al., 1961; Basu et al., 1962). Sur une souche de P. cynomolgi résistante à la DDS,

¹ Cette étude a été partiellement financée par une subvention de l'Organisation mondiale de la Santé.

² Précédemment : Malaria Institute of India.

aucun phénomène de résistance croisée à la pyriméthamine n'a été observé alors que cette souche présentait une résistance croisée à la sulfadiazine (Ramakrishnan et al., 1961); le mode d'action de la DDS était donc comparable à celui de la sulfadiazine. En outre, on sait que le PAB et l'acide folique sont des antagonistes pour la DDS comme pour la sulfadiazine (études non publiées, Malaria Institute of India, 1962).

Nous avons pour notre part étudié l'action combinée de la DDS et de la pyriméthamine contre P. gallinaceum chez des poussins¹ et contre P. cynomolgi bastianellii² chez le singe Macaca mulatta. Les résultats de nos recherches sont exposés ci-après.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 P. gallinaceum. On a injecté par voie intraveineuse à des poussins de 7 à 9 jours (Rhode Island rouge) $0,5 \times 10^6$ cellules parasitées par gramme de poids corporel. Nés au laboratoire, les poussins ont été nourris normalement et maintenus à une température de 30 à 32,2°C. Après l'inoculation, on a choisi des sujets au hasard pour traitement aux doses indiquées ci-après. Les antipaludiques ont été administrés deux fois par jour par la voie orale. La première dose a été donnée environ quatre heures après l'inoculation, le traitement complet, soit sept doses, s'échelonnant sur trois jours et demi.

Le degré d'infection a été évalué le quatrième jour après l'inoculation. Deux frottis sanguins ont été préparés pour chacun des sujets d'épreuve et des sujets témoins et deux personnes ont examiné indépendamment les frottis colorés.

¹ La souche de P. gallinaceum était celle que Jaswant Singh, Basu & Ray avaient utilisée en 1952.

² Souche de P. cynomolgi bastianellii obligeamment fournie par le Professeur P. C. C. Garnham, de Londres, et entretenue à l'Institut depuis 1961 sur des singes Macaca mulatta par inoculation sanguine.

1.2 P. cynomolgi bastianellii. Des singes pesant chacun de 2 à 4,5 kg ont reçu par voie intraveineuse 5×10^6 cellules parasitées par kilogramme de poids corporel. Le traitement a été entrepris au moment où l'infection des érythrocytes atteignait 0,1 à 0,2 %. Les antipaludiques ont été administrés par la voie orale une fois par jour pendant sept jours. On a mesuré le degré d'infection en examinant quotidiennement les frottis sanguins des animaux d'expérience et des animaux témoins jusqu'au lendemain du dernier jour du traitement.

1.3 Plan d'expérience et analyse biométrique des résultats

P. gallinaceum. Différents dosages de DDS et de pyriméthamine¹ ont été préparés en suspension aqueuse. Pour chaque produit, l'éventail des dosages a été établi (d'après les données disponibles) de façon à réduire le taux d'infection des cellules d'environ 10 à 90 %. Dans ces limites, on a choisi trois à quatre concentrations échelonnées à intervalles logarithmiques égaux.

Les animaux ont été traités par groupes au moyen de chacun des deux produits et d'un certain nombre d'associations. Chaque schéma de traitement a été appliqué autant que possible à un groupe de deux à cinq sujets. Les animaux d'expérience ont été numérotés en série et répartis au hasard en différents groupes de traitement. On a gardé pour observation un assez grand nombre de sujets témoins. La mortalité survenue au cours de la période d'expérimentation n'a pas permis de maintenir d'égalité numérique des groupes. Mais pour chaque schéma de traitement les résultats consignés représentent une moyenne des observations sur au moins deux et au plus cinq sujets.

En appliquant le système factoriel, avec dosages échelonnés, nous avons essayé de déterminer exactement la nature de l'action combinée des diverses associations. Pour dénombrer les cellules parasitées, nous avons examiné 10^4 érythrocytes sur chaque lame.

¹ Avlosulfone (Dapsone) : comprimés à 0,1 g; pyriméthamine Daraprim : comprimés à 25 mg.

P. cynomolgi bastianellii. Chaque schéma de traitement a été appliqué à un groupe de deux à cinq singes. On a pris comme critère de traitement radical la disparition complète du parasite, 24 heures après la fin du traitement, chez tous les sujets d'un même groupe, quel que soit le schéma de traitement. Une fois déterminées ainsi les doses efficaces minimums pour la DDS et la pyriméthamine, on disposait d'un point de départ pour mettre à l'épreuve diverses associations des deux produits. Dans chaque association, chaque produit a été employé à une dose inférieure à la dose efficace minimum.

Pour les essais sur P. gallinaceum, les résultats des deux dénombrements de parasites dans les deux frottis sanguins ont été additionnés et exprimés en nombre de parasites pour 2×10^4 érythrocytes. On a ensuite déterminé géométriquement la densité parasitaire moyenne (DPM) correspondant à chaque schéma de traitement.

L'indice de réponse (IR) a été calculé sous la forme du rapport entre la DPM chez les sujets traités et la valeur correspondante chez les sujets témoins. Pour tracer les lignes de régression des probits en fonction du logarithme de la dose, on a converti les indices de réponse ainsi obtenus en probits. Dans la majorité des cas, on a constaté que ces lignes de régression étaient des droites. Pour chacun des deux produits employés isolément et pour chaque association, on a déterminé par interpolation graphique, à partir des lignes de régression, les doses DE_{85} et DE_{50} (c'est-à-dire les doses assurant respectivement une réduction de 85 et de 50 % de la densité parasitaire par rapport aux sujets témoins). Ces deux valeurs ont servi à établir des bologrammes indiquant la nature de l'action combinée des deux produits (Gaddum, 1952).

On a également établi des bologrammes pour étudier l'action combinée des deux médicaments contre P. cynomolgi. Pour cela, on a utilisé une série de doses inférieures à la dose efficace minimum provoquant la disparition complète du parasite.

2. RESULTATS

P. gallinaceum. Les résultats de l'examen sanguin des sujets traités et des sujets témoins sont présentés ci-après (tableau 1).

TABLEAU 1. DENSITES PARASITAIRES ET INDICES DE REPONSE CHEZ DES POUSSINS INFECTES PAR P. GALLINACEUM APRES TRAITEMENT PAR DIVERSES DOSES DE DDS ET DE PYRIMETHAMINE ADMINISTREES ISOLEMENT OU EN ASSOCIATION ET CHEZ LES SUJETS TEMOINS (DOSES EN MG POUR 50 G DE POIDS CORPOREL)

DDS	Pyriméthamine	0,0015	0,00075	0,000375	0,0001875	0,00009375	Pyriméthamine-0
12,8	DPM	1,0	1,0	36,3	1,7	-	60,5
	IR	0,008	0,008	0,278	0,013	-	0,464
6,4	DPM	1,7	2,0		33,0		1 499,7
	IR	0,013	0,015		0,253		11,507
3,2	DPM	3,3		35,8	382,8	5 382,7	7 568,3
	IR	0,025		0,274	2,937	41,303	58,074
1,6	DPM	3,7	70,3	792,50	6 441,7	7 961,6	11 967,0
	IR	0,028	0,539	6,081	49,429	61,092	91,827
0,8	DPM			8 590,1	10 940,0	12 134,0	14 555,0
	IR			65,915	83,947	93,109	111,686
DDS-0	DPM	1 039,9	9 141,1	9 763	94 890,0	13 397,0	13 032,0
	IR	7,979	70,143	74,915		102,800	(témoins)

DPM : Densité parasitaire moyenne par sujet pour 2×10^4 érythrocytes.

IR : (Indice de réponse) : $\frac{DPM_{tr.}}{DPM_{tém.}} \times 100$ (Plus le traitement est efficace, plus l'indice de réponse est bas).

MPDtr. : Densité parasitaire moyenne par sujet traité pour 2×10^4 érythrocytes.

DPM tém. : Densité parasitaire moyenne par sujet témoin pour 2×10^4 érythrocytes.

Chez les témoins, la densité parasitaire moyenne a atteint 13,032, tandis que dans les groupes traités, les valeurs ont été faibles pour un grand nombre des associations essayées. Pour les associations comprenant des doses très faibles de chacun des deux produits, la densité parasitaire moyenne s'est établie à des niveaux comparables chez les sujets d'épreuve et chez les témoins. D'après l'indice de réponse, on pouvait entrevoir une corrélation entre les dosages et la réponse. Aussi, moyennant les conversions appropriées, avons-nous tracé le graphique de la figure 1, qui illustre la relation entre la dose et l'indice de réponse.

A partir de la ligne de régression des probits en fonction du logarithme de la dose (figure 1), nous avons déterminé les doses DE_{50} et DE_{85} de la DDS et de la pyriméthamine employées isolément ou en association (tableau 2). Pour la DDS employée seule, la DE_{85} et la DE_{50} ont été respectivement de 5,9 mg/50 g et de 3,5 mg/50 g. Les valeurs correspondantes pour la pyriméthamine se sont établies à 0,00126 mg/50 g et 0,00076 mg/50 g. Avec cinq des schémas de traitement, on a obtenu une réponse à 85 % en associant des doses inférieures à celles qui permettaient d'obtenir le même résultat lorsque chaque produit était employé isolément. Avec 0,8 mg/50 g de DDS, la dose de pyriméthamine nécessaire pour obtenir une réponse à 85 % était la même que la dose employée isolément. Pour la réponse à 50 %, les doses associées étaient dans chaque cas inférieures à la dose d'activité égale de chacun des deux produits. Dans aucun cas la DE_{50} ou la DE_{85} des associations essayées n'a dépassé la dose correspondante de l'un ou l'autre produit employé isolément, ce qui semble indiquer qu'en association ces deux produits n'ont pas d'action antagoniste.

TABLEAU 2. VALEURS DE LA DE₈₅ ET DE LA DE₅₀ POUR LA DDS ET LA PYRIMETHAMINE EMPLOYEES ISOLEMENT OU EN ASSOCIATION DANS LE TRAITEMENT DE L'INFECTION A P. GALLINACEUM

(Dosages en mg pour 50 g de poids corporel)

Dose	DE ₈₅	DE ₅₀
	(Doses de DDS)	(Doses de DDS)
DDS + 0 pyriméthamine	5,9	3,5
DDS + 0,00009 "	4,4	2,2
DDS + 0,0001875 "	2,3	1,4
DDS + 0,000375 "	1,4	0,9
	(Doses de pyriméthamine)	(Doses de pyriméthamine)
Pyriméthamine + 3,2 DDS	0,00014	0,00009
" + 1,6 "	0,00032	0,00020
" + 0,8 "	0,00126	0,00050
" + 0 "	0,00126	0,00076

Deux bologrammes (figures 2 et 3) ont également confirmé cette conclusion. Ils indiquent en outre qu'il y a potentialisation des deux produits dans le mélange. Des associations les plus efficaces pour une réponse à 85 %, la moins riche en chacun des deux produits comprenait 1,4 mg/50 g de DDS et 0,00032 mg/50 g de pyriméthamine. Pour ce dosage, les isoboles étaient proches de l'origine du bologramme. Cependant, l'effet de potentialisation était moins marqué pour la DE₅₀ que pour la DE₈₅ (figure 3). La forme du bologramme indique que si l'on réduit la proportion de l'un des deux produits, l'effet de l'association évolue progressivement de la potentialisation vers un simple effet à addition.

Les constatations rapportées ci-dessus concernant l'action combinée de la DDS et de la pyriméthamine ont été confirmées par des essais sur P. cynomolgi bastianelli chez le singe. En effet, alors que les doses efficaces minimums étaient respectivement de 0,15 mg/kg et 0,05 mg/kg pour la DDS et la pyriméthamine employées isolément (tableau 3), des doses inférieures se sont révélées beaucoup plus actives lorsque les deux produits étaient associés (tableau 3 et figure 4).

TABLEAU 3. REPONSE DE P. CYNOMOLGI BASTIANELLII A LA DDS ET A LA PYRIMETHAMINE EMPLOYEES Isolement ou en association

Doses (en mg/kg pendant 7 jours)		Nombre d'animaux d'expérience	Elimination du parasite (nombre de cas)	Persistance du parasite (nombre de cas)	Délai d'élimi- nation du para- site (en heures)		
DDS	Pyrimé- thamine						
	0,5	1	1	Néant	120		
	0,25	2	2	Néant	96	120	
	0,05	5	5	Néant	120	144	
	0,025	5	4	1	(4)	(1)	
					120	144	
0,5		4	4	Néant	(1)	(3)	
					96	144	168
0,25		5	5	Néant	(1)	(2)	(1)
					120	144	168
0,15		5	5	Néant	(2)	(2)	(1)
					120	144	168
0,05		2	2	2	(2)	(1)	(2)
						-	
0,05	+ 0,02	2	2	Néant	168	168	
0,005	+ 0,02	2	2	Néant	144	144	
0,075	+ 0,025	2	2	Néant	168	168	
0,005	+ 0,002	2	2	Néant	144	144	
0,05	+ 0,002	2	2	Néant	120	96	
0,0025	+ 0,001	1	1	Néant	144		
0,00125	+ 0,0005	3	1	2	168		

Note : Entre parenthèses : nombre d'animaux.

L'association efficace contenant la plus faible dose de chacun des deux produits était un mélange de 0,0025 mg/kg de DDS et 0,001 mg/kg de pyriméthamine. Pour ce dosage, les isoboles étaient très proches de l'origine du bologramme. Toutefois, l'élimination des parasites était plus rapide avec une association de 0,05 mg de DDS et 0,002 mg de pyriméthamine par kilogramme qu'avec tout autre dosage.

3. DISCUSSION

Pour interpréter les résultats, la méthode du bologramme a paru indiquée puisqu'il s'agissait d'étudier l'action combinée de la DDS et de la pyriméthamine. Les bologrammes ont attesté une potentialisation des deux produits à certains dosages. Pour d'autres, on n'a constaté qu'un simple effet d'addition. Tel a été le cas, par exemple, dans l'infection à P. gallinaceum, lorsque les proportions étaient les suivantes : i) DDS : 3,2 + pyriméthamine : 0,00009 mg par 50 grammes; ii) 0,8 + 0,00126 mg par 50 grammes (figure 2).

Le puissant effet de potentialisation observé avec les associations de pyriméthamine et de sulfadiazine est vraisemblablement dû au fait que les deux produits agissent en différents points d'une même voie métabolique (Rollo, 1955). Lorsqu'il y a simplement effet d'addition, c'est probablement parce que les produits agissent en un même point de la voie métabolique en jeu ou sur des voies différentes. L'action de la sulfadiazine et celle de la pyriméthamine sont annihilées par le PAB ou l'acide folique et il n'y a pas de résistance croisée pyriméthamine/sulfadiazine chez P. gallinaceum (Rollo, 1955). De même, le PAB et l'acide folique sont des antagonistes pour la DDS (études non publiées du Malaria Institute of India) et il n'y a pas de résistance croisée DDS/pyriméthamine (Ramakrishnan, Basu et al, 1961). Il semble donc que la DDS et la pyriméthamine agissent sur la même voie métabolique, mais en des points différents.

On a également mis en évidence une potentialisation de la sulfadiazine et de la pyriméthamine dans le paludisme humain (Hurly, 1959). Selon Basu et al (1961), on obtient en combinant de petites doses de DDS à une petite dose de pyriméthamine (100 et 50 mg de la première et 12,5 mg de la seconde) une association efficace et apparemment potentialisée contre les infections à P. falciparum ou à P. vivax.

Il a été établi que, pour éliminer P. gallinaceum chez le poussin, il faut des doses de DDS plus élevées (5,9 mg/50 g, soit 118 mg/kg) que pour faire disparaître l'infection à P. cynomolgi bastianellii chez le singe (0,5 mg/kg). Ainsi s'explique peut-être que les doses potentialisées par association soient des doses plus faibles dans le cas de P. cynomolgi bastianellii que dans celui de P. gallinaceum.

RESUME

1. On a étudié l'action plasmodicide de la DDS et de la pyriméthamine en les employant, soit isolément, soit en association, contre P. gallinaceum chez des poussins et contre P. cynomolgi bastianellii chez le singe.

2. Pour certains dosages, l'association des deux produits est potentialisée. Pour des dosages plus faibles, il y a seulement un effet d'addition.

3. P. gallinaceum du poulet et P. cynomolgi bastianellii du singe réagissent différemment à l'administration d'une association des deux produits.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à exprimer leur gratitude au Dr Harwant Singh pour les conseils techniques qu'il leur a donnés. En outre, ils remercient de leur aide MM. Puran Singh et S. Venkatesan.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Archibald, H. M. & Ross, C. M. (1960) J. trop. Med. Hyg., 63, 25
- Basu, P. C., Mondal, M. M. & Chakravarti, S. C. (1962) Ind. J. Malariol., 16, 21
- Gaddum, J. H. (1952) J. Roy. Statist. Soc., 14, 141
- Hurly, M. G. D. (1959) Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg., 53, 412
- Jaswant Singh, Basu, P. C. & Ray, A. P. (1952) Ind. J. Malariol., 6, 145
- Ramakrishnan, S. P., Basu, P. C., Harwant Singh & Nau Nihal Singh (1961) OMS, document WHO/Mal/316
- Rollo, I. M. (1955) Brit. J. Pharmacol., 10, 208

FIG. 1

RELATION ENTRE LA DOSE ET L'INDICE DE RÉPONSE EN UNITÉS MÉTAMÉTRIQUES
(DANS L'INFECTION A *P. gallinaceum* DU POUSSIN)

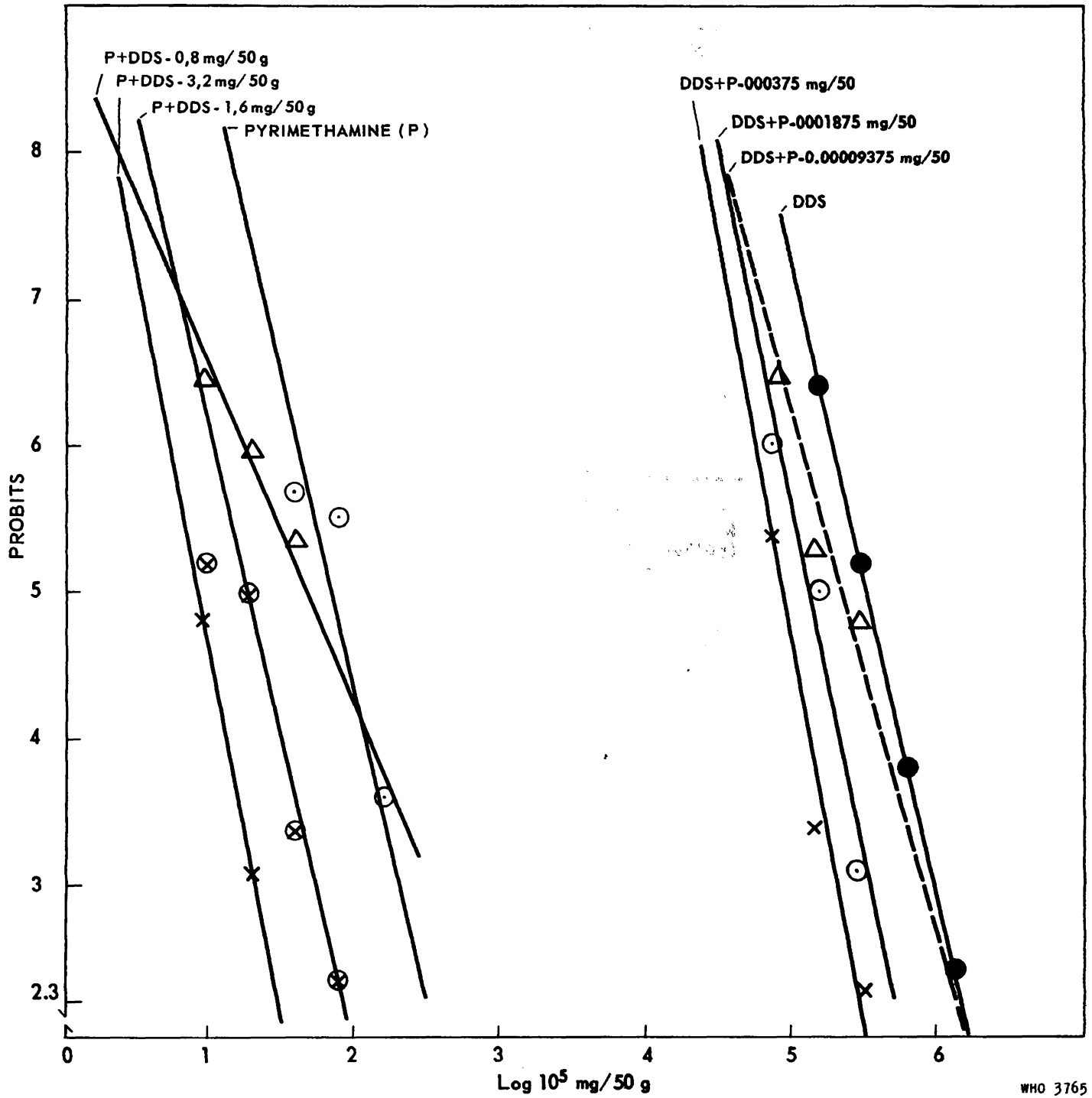
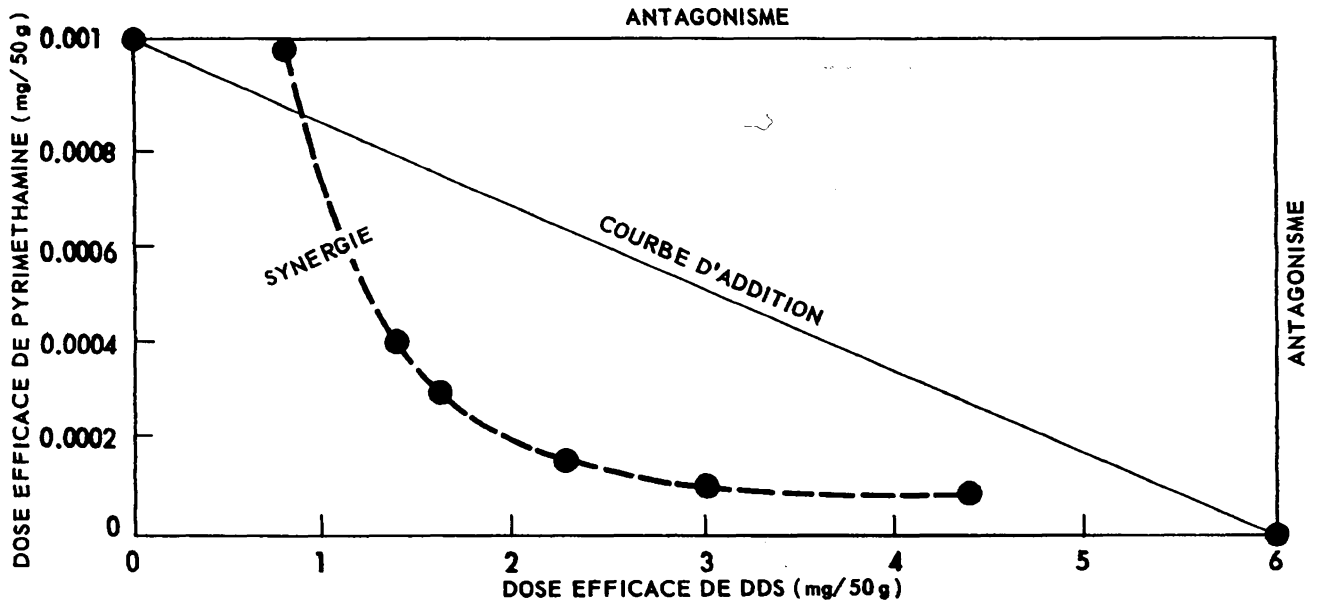


FIG. 2

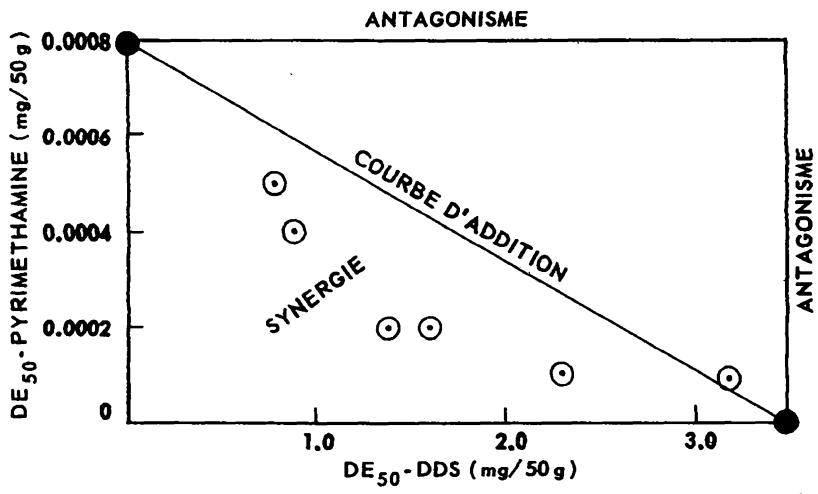
VALEURS DE LA DE_{85} POUR LA PYRIMETHAMINE ET LA DDS ADMINISTRÉES
ISOLEMENT OU ENSEMBLÉ EN PROPORTIONS VARIABLES A DES POUSSINS
INFECTES PAR *P. gallinaceum*



WHO 3766

FIG. 3

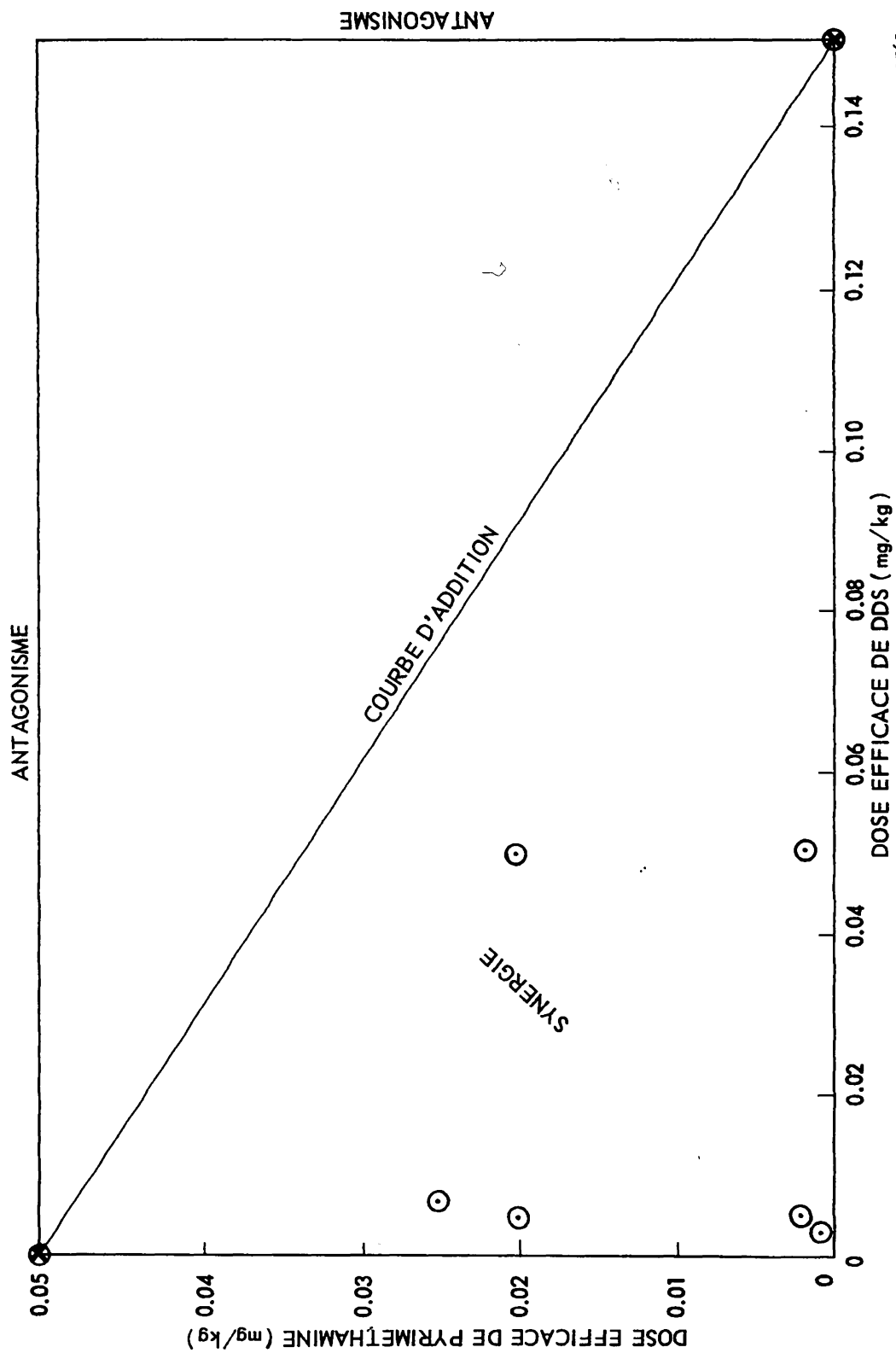
VALEURS DE LA DE_{50} POUR LA PYRIMETHAMINE ET LA DDS ADMINISTRÉES ISOLEMENT OU ENSEMBLE EN PROPORTIONS VARIABLES A DES POUSSINS INFECTÉS PAR *P. gallinaceum*



WHO 3767

FIG. 4

ACTION COMBINÉE DE LA DDS ET DE LA PYRIMETHAMINE CONTRE *P. cynomolgi bastianelli* CHEZ LE SINGE



Le but des documents de la Série WHO/Mal est le suivant :

- a) mettre le personnel de l'OMS, les instituts nationaux, les chercheurs et les travailleurs de la santé publique au courant de l'évolution des recherches sur le paludisme et des progrès de l'éradication du paludisme au moyen d'exposés succincts relatifs à quelques problèmes en cause;
- b) distribuer, aux catégories de lecteurs indiquées ci-dessus, les rapports d'opérations et autres communications qui présentent un intérêt particulier, mais qui ne sont pas normalement imprimés dans les publications de l'OMS;
- c) communiquer aux intéressés différents articles qui sont destinés à la publication mais qui, en raison de leur actualité, méritent d'être rapidement connus.

La parution d'un article dans cette série ne constitue donc pas une publication officielle et un tel article peut donc, avec l'accord de l'auteur et de l'OMS, être publié dans un périodique de l'OMS ou ailleurs.

Les articles signés n'engagent que leurs auteurs. La mention des manufactures et des produits commerciaux n'implique pas que ces maisons ou leurs produits soient recommandés ou approuvés par l'Organisation mondiale de la Santé de préférence à d'autres.