

PLASMODIUM BERGHEI ET ANTIMALARIQUES
A ACTION DE LONGUE DUREE

F. BENAZET

Laboratoires de Recherches de la Société des Usines
Chimiques Rhône-Poulenc - Vitry-sur-Seine - France

Depuis quelques années nous essayons de sélectionner au laboratoire un antimalarique à longue durée d'action, avec l'espoir que ce produit, administré à l'homme par voie orale une fois par mois ou moins souvent, exerce chez celui-ci une prophylaxie suppressive au moins égale à celle que permet d'obtenir l'ingestion hebdomadaire de chloroquine.

Pour sélectionner un tel produit, nous avons choisi comme épreuve l'infestation expérimentale de la souris à P. berghei au lieu d'un paludisme aviaire, car nous avons jugé préférable d'utiliser un mammifère plutôt qu'un oiseau pour l'étude de produits qui sont destinés à l'homme.

A l'aide de cette méthode de discrimination, nous avons retenu quelques produits dont l'expérimentation clinique est en cours ou projetée. Nous n'avons pas l'intention de parler des premiers résultats obtenus chez l'homme, mais de relater les résultats des essais au laboratoire de ces produits qui diffèrent de tous les antimalariques connus par la longue durée de leur action après administration par voie orale à la souris.

1. METHODES DE SELECTION

Action curative. Les souris sont inoculées par injection de 0,25 ml i.p. d'une suspension en soluté physiologique de sang d'autres souris, elles-mêmes infectées par P. berghei. Le nombre d'hématozoaires injectés est d'environ 3 500 000.

Les souris sont traitées par voie orale. Quatre traitements sont effectués à 24 heures d'intervalle, le premier 4 heures après l'infection : produits en solution aqueuse sous forme de méthanesulfonate, chloroquine sous forme de sulfate.

L'évolution de l'infection est suivie par examen microscopique du sang des souris tous les deux jours depuis le lendemain de l'arrêt du traitement jusqu'au 21ème jour après l'inoculation; à chaque examen est déterminé le pourcentage d'hématies parasitées.

A ce moment là on détermine la DC_{50} du produit, c'est-à-dire la dose de ce produit qui empêche l'apparition des parasites dans le sang de 50 % des souris pendant toute la durée de la période d'observation. Il est important de préciser cette durée, de même que le critère d'activité choisi, car la DC_{50} varie beaucoup en fonction de ces deux facteurs.

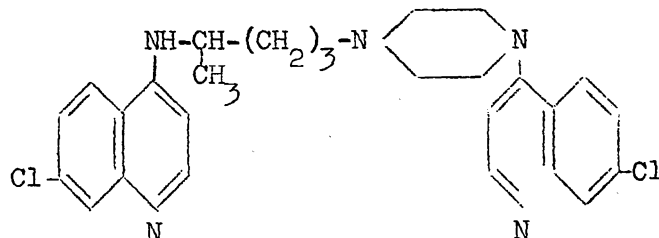
Action préventive. Le traitement, unique, est effectué par voie orale à des temps échelonnés de 60 à 15 jours avant l'infection qui est réalisée comme il a été indiqué ci-dessus.

Le degré de parasitémie est déterminé tous les deux jours depuis l'apparition des hématozoaires dans le sang des souris témoins non traitées jusqu'au 18ème jour après l'inoculation.

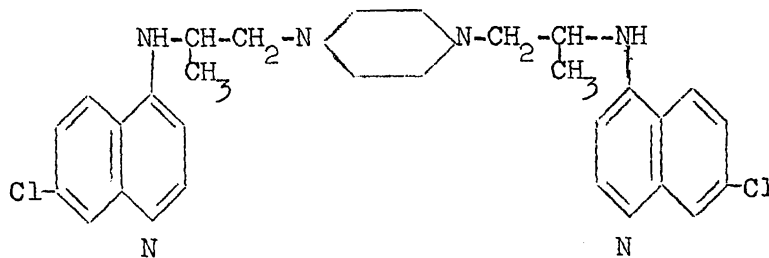
On détermine alors la DP_{50} et la DP_{100} du produit essayé, c'est-à-dire les doses qui empêchent l'apparition des parasites respectivement chez la moitié et la totalité des souris pendant toute la durée de la période d'observation.

2. PRODUITS RETENUS ET LEUR ACTIVITE

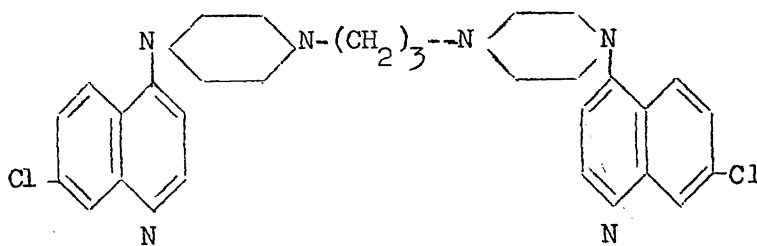
Ces méthodes de sélection nous ont permis de retenir quelques-uns des produits essayés en raison de leur bonne activité. Nous indiquons ci-après les formules des plus intéressants d'entre eux (12.160 R.P. - 12.278 R.P. - 13.228 R.P. - 14.153 R.P.) :



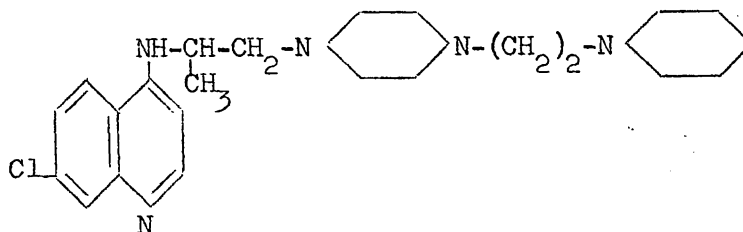
$\overline{\overline{}}$ (Chloro-7 quinolyl-4) amino-4 pentyl $\overline{\overline{}}$ -1 (chloro-7 quinolyl-4)-4 pipérazine - 12.160 R.P.



Bis $\overline{\overline{}}$ (chloro-7 quinolyl-4) amino-2 propyl $\overline{\overline{}}$ -1,4 pipérazine 12.278 R.P.



Bis $\overline{\overline{}}$ (chloro-7 quinolyl-4)-4 pipérazino $\overline{\overline{}}$ -1,3 propane 13.228 R.P.



$\overline{\overline{}}$ (Chloro-7 quinolyl-4) amino-2 propyl $\overline{\overline{}}$ -1 (pipéridino-2 éthyl)-4 pipérazine 14.153 R.P.

Du point de vue curatif, ces quatre produits manifestent une activité égale (12.160 R.P. - 12.278 R.P. - 14.153 R.P.) ou un peu supérieure (13.228 R.P.) à celle de la chloroquine. Les DC_{50} sont de 10 mg/kg/jour p.o. pour les trois premiers produits et pour la chloroquine prise comme produit de référence, de 7,5 mg/kg/jour p.o. pour le 13.228 R.P.

Du point de vue préventif, les quatre produits protègent les souris vis-à-vis d'une inoculation de P. berghei intervenant 30 jours après le traitement unique par voie orale; le 12.278 R.P. les protège pendant 60 jours. Comme le montre le tableau suivant, cette durée d'action est beaucoup plus longue que celle des principaux antimalariques de synthèse à action suppressive (chloroquine, amodiaquine, chlorguanil et pyriméthamine) qui n'atteint pas 24 heures après administration de ces produits à leur DL_0 p.o.¹

¹ Les résultats de travaux de chimiothérapie expérimentale utilisant l'infection de la souris par P. berghei ont été présentés par le regretté Professeur Jean Schneider au cours du Colloque international sur P. berghei, tenu à l'Institut de Médecine tropicale "Prince Léopold", à Anvers, le 4-6 décembre 1964. Cet exposé a rapporté les résultats obtenus avec trois produits : 14.900 R.P., 12.278 R.P. et 12.494 R.P.. L'article est sous presse. (Red.)

TABLEAU 1. ACTIVITE PREVENTIVE
SUR L'INFECTION DE LA SOURIS A P. BERGHEI

(Traitement unique par voie orale)

Produits	Temps entre traitement et inoculation (en jours)	Activité préventive	
		DP ₅₀ en mg/kg p.o.	DP ₁₀₀ en mg/kg p.o.
12.160 R.P.	15	155	200
	30	365	500
	60	supérieure à 500	
12.278 R.P.	15	150	200
	30	260	500
	60	350	500
13.228 R.P.	15	90	200
	30	160	500
	60	400	supérieure à 500
14.153 R.P.	15	150	200
	30	350	500
	60	supérieure à 500	
Chloroquine	1	inactif à 200	
Amodiaquine	1	inactif à 200	

Il faut signaler que les produits étudiés, qui sont des amino-4 quinoléines de même que la chloroquine et l'amodiaquine, exercent comme ces dernières une action parasitostatique et non parasiticide vis-à-vis des hématozoaires; il est facile de s'en rendre compte en prolongeant la période d'observation des essais d'une à deux semaines au-delà de la limite de 18 jours indiquée ci-dessus.

Il faut également noter que P. berghei manifeste une résistance croisée, d'une part vis-à-vis de la chloroquine, d'autre part vis-à-vis des produits 12.160 R.P. - 13.228 R.P. et 14.153 R.P.; au contraire, il n'y a pas de résistance croisée vis-à-vis de la chloroquine et du 12.278 R.P.

3. TOXICITE PAR VOIE ORALE CHEZ LA SOURIS

La toxicité aiguë et la toxicité subaiguë (3 administrations à 24 heures d'intervalle) des produits ont été déterminées chez la souris comparativement à celles de la chloroquine. Les DL_{50} sont indiquées dans le tableau 2.

TABLEAU 2. TOXICITE AIGUE ET SUBAIGUE P.O. CHEZ LA SOURIS

Produits	Toxicité aiguë	Toxicité subaiguë (administration pendant 3 jours consécutifs)
	DL_{50} en mg/kg p.o.	DL_{50} en mg/kg/jour p.o.
12.160 R.P.	900	820
12.278 R.P.	800	610
13.228 R.P.	800	450
14.153 R.P.	800	375
Chloroquine	450	260

Ce tableau montre que les 4 produits sont environ 2 à 3 fois moins toxiques que la chloroquine.

4. CIRCULATION CHEZ LA SOURIS ET LE RAT

Du point de vue de la circulation chez l'animal, les quatre produits se comportent pratiquement de la même manière.

Après administration unique par voie orale, ils déterminent des concentrations dans le sang de l'ordre de celles qui succèdent à l'ingestion d'une dose équivalente de chloroquine ou même un peu inférieures à celles-ci et leur persistance dans le sang est également de l'ordre de celle de la chloroquine.

Au contraire, dans l'urine ces produits sont éliminés en quantité beaucoup plus faible que la chloroquine, alors que la durée de leur excrétion est pratiquement égale à celle de ce dernier produit.

La différence la plus importante entre ces nouveaux produits et la chloroquine concerne les affinités respectives pour certains organes et en particulier pour le foie et le rein. L'affinité hépatique des quatre produits est certainement leur principale originalité; elle se manifeste par le stockage pendant plusieurs mois d'une quantité importante de produit dans le foie.

De cette affinité hépatique on peut se rendre compte de diverses manières, en particulier par des méthodes de dosage physico-chimiques, par des méthodes biologiques et par l'examen histologique de l'organe.¹

Dosages physico-chimiques. Les dosages par fluorométrie ou par spectrophotométrie U.V. permettent de suivre dans le temps l'évolution des teneurs sanguines et hépatiques et de l'excrétion urinaire des produits après leur administration par voie orale.

A titre d'exemple, nous indiquons dans le tableau 3 les résultats des dosages par fluorométrie qui ont été effectués chez le rat après administration de 12.278 R.P. et de chloroquine aux doses de 50 et 100 mg/kg p.o. Ce tableau montre notamment que les teneurs hépatiques en 12.278 R.P. trouvées 60 jours après l'administration du produit correspondent à peu près à celles que l'on observe huit jours après l'ingestion d'une dose équivalente de chloroquine.

¹ Travaux de M. Fournel, Dr Ganter et Dr vétérinaire Julou.

Méthodes biologiques. Nous avons confirmé le stockage hépatique des produits après leur administration par voie orale chez le rat en prélevant le foie des animaux à des temps échelonnés après l'ingestion du produit étudié, en le broyant et en traitant des souris infestées par P. berghei à l'aide de dilutions successives des broyats ainsi obtenus. Les teneurs hépatiques ainsi déterminées correspondent approximativement à celles qui ont été trouvées par dosage fluorométrique.

Examen histologique. L'examen histologique de foies de rats traités par le 12.278 R.P. a permis de déceler le produit dans cet organe sous forme de granulations de taille variable, dont certaines sont fluorescentes. Des granulations se voient dans le parenchyme hépatique, mais la plupart se trouvent dans les cellules de Küpffer. Il semble bien que l'affinité hépatique manifestée par le 12.278 R.P. (de même que celle des 3 autres produits) soit en réalité une affinité pour le système réticulo-endothélial.

On pouvait craindre que le stockage de ces produits dans le foie ne provoque des altérations de cet organe. Cependant des essais de tolérance semi-chronique de un à trois mois ont montré que l'administration de ces produits chez le rat et le chien aux doses quotidiennes respectives de 50 et 25 mg/kg p.o. ne provoque pas de trouble notable des principales fonctions ni d'atteinte parenchymateuse des divers organes.

CONCLUSION

Si l'on administre du 12.278 R.P. à des rats ou à des souris et si on leur inocule P. berghei 15 jours plus tard, ces animaux sont protégés, contrairement à ce qui se passe dans le cas de la chloroquine. Cependant les dosages chez le rat montrent que, au moment de l'inoculation, il n'y a pratiquement plus de produit décelable dans le sang tandis que les teneurs hépatiques sont encore élevées.

Au contraire l'activité préventive ne se manifeste plus si l'inoculation intervient lorsque le produit n'est plus décelable dans le foie.

De plus, des 4 produits étudiés, celui qui a la plus longue durée d'action est celui (12.278 R.P.) qui persiste le plus longtemps dans le foie.

Ces faits ne démontrent pas mais font supposer que le produit contenu dans le foie est responsable de la longue durée d'action du 12.278 R.P.

En admettant que ce soit bien le cas, il resterait à savoir comment le produit qui se trouve dans le foie agit sur les hématozoaires, en particulier si le foie libère dans le sang du 12.278 R.P. ou un métabolite de celui-ci non décelables mais actifs sur les hématozoaires ou si la destruction des hématozoaires se fait au niveau même du foie comme c'est le cas pour les microfilaires au cours des traitements par la carbamazine.

RESUME

L'utilisation de l'infestation expérimentale de la souris et du rat par P. berghei a permis la sélection d'amino-4 quinoléines qui, à l'inverse des antimalariques connus, manifestent par voie orale chez ces animaux une action de très longue durée.

Ces produits montrent une forte affinité pour le foie (en particulier le mésenchyme hépatique) où ils sont décelables longtemps après avoir disparu du sang.

Il semble y avoir une relation entre la durée d'action de ces produits et leur affinité hépatique.

SUMMARY

For some years, the author has been attempting to find an antimalarial which will have a suppressive effect equal to chloroquine but which can be given orally at monthly or longer intervals.

Compounds of potential antimalarial action have been screened using Plasmodium berghei infection in mice and further investigations have been made using rats.

Four products tested:

12160 RP = 1- $\sqrt{4}$ -(7-chloro-4-quinolylamino) penty $\sqrt{7}$ -4-(7-chloro-4-quinoly) piperazine

12278 RP = 1,4-bis $\sqrt{2}$ -(7-chloro-4-quinolyamino)propyl $\sqrt{7}$ piperazine

13228 RP = 1,3-bis $\sqrt{4}$ -(7-chloro-4-quinoly) piperazinyl $\sqrt{7}$ propane

14153 RP = 1- $\sqrt{2}$ -(7-chloro-4-quinolyamino)propyl $\sqrt{4}$ -(2-ethylpiperidinyl)piperazine,

showed a curative effect against P. berghei equal to that of chloroquine or, in the case of 13228 RP, superior to it. All four compounds had a preventive action of up to 30 days following a single oral dose and the effect of 12278 RP lasted up to 60 days.

Chloroquine resistant P. berghei developed a resistance to 12160 RP, 13228 RP and 14153 RP but no cross-resistance could be produced with 12278 RP.

The toxicity of the four compounds was shown to be two to three times less than chloroquine.

The compounds showed a marked affinity for the liver, particularly the reticulo-endothelial cells and were detectable in this site a long time after their disappearance from the blood. 12278 RP had the longest persistence in the liver and if it could no longer be detected in this site no suppressive antimalarial action was to be found. Hence, it appears that there is a relation between the duration of action of the compounds and their affinity for the liver.

The method of action of the compounds on plasmodia when stored in the liver is not yet understood - the three possibilities suggested being that 12278 RP may be released gradually from the liver into the blood, or a metabolite which could not be detected is so released or perhaps that the drug acts directly on the parasites in the liver.

TABEAU 3. COMPARAISON DU 12.278 R.P. ET DE LA CHLOROQUINE

Teneurs dans le sang et le foie, excretion urinaire après administration par voie orale chez le rat (dosages par fluorométrie)

Liquide biologique ou organe	Produit	Dose en mg/kg p.o.	Concentrations en µg/ml de sang, ou en µg/g de foie, quantités en µg excrétées dans l'urine en 24 heures							
			1 jour (a)	2 jours	4 jours	8 jours	15 jours	30 jours	60 jours	
Sang	12.278 R.P.	50	1,1	0,1	0,25	0,6	inf. à 0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1
		100	1,2	0,2	0,3	1	0,4	inf. à 0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1
	Chloroquine	50	1,8	0,8	0,2	0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1
		100	1,9	1,4	0,5	0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1	inf. à 0,1
Foie	12.278 R.P.	50	550	400	320	260	200	110	25	
		100	800	590	700	310	460	290	55	
	Chloroquine	50	660	60	50	10	6	1	inf. à 1	
		100	500	155	115	45	9	1,5	inf. à 1	
Urine	12.278 R.P.	50	100	20	inf. à 1	2	inf. à 1	inf. à 1	inf. à 1	
		100	160	50	inf. à 1	3	inf. à 1	inf. à 1	inf. à 1	
	Chloroquine	50	7 500	4 500	700	110	5	inf. à 1	inf. à 1	
		100	13 500	13 700	2 800	370	13	inf. à 1	inf. à 1	

(a) Temps entre l'administration et le dosage.

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.

On notera que les résumés de travaux non publiés représentent souvent des rapports préliminaires d'investigations; les conclusions de ces travaux peuvent donc être sujettes à des révisions ultérieures.

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.